

UNIVERSITÉ DE GENÈVE
Section de biologie végétale
Laboratoires de Microbiologie Générale
et de Chimie Taxonomique
Section de Pharmacie
Laboratoire de Pharmacognosie

FACULTÉ DES SCIENCES
Professeur G. TURIAN

J. MIEGE

J. KAPETANIDIS

**Localisation et effets antibiotiques
de la Cnicine extraite de
CENTAUREA BELANGERIANA (DC)
Bornm. sur des microorganismes**

THÈSE

*présentée à la Faculté des Sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences, mention biologique*

par

**Naz DOLATSHAHI-MISSAGHIEH
— TEHERAN-IRAN**

Thèse N° 1928

GENÈVE
Imprimerie Nationale
1979

UNIVERSITÉ DE GENÈVE
Section de biologie végétale
Laboratoires de Microbiologie Générale
et de Chimie Taxonomique
Section de Pharmacie
Laboratoire de Pharmacognosie

FACULTÉ DES SCIENCES
Professeur G. TURIAN

J. MIEGE

J. KAPETANIDIS

**Localisation et effets antibiotiques
de la Cnicine extraite de
CENTAUREA BELANGERIANA (DC)
Bornm. sur des microorganismes**

THÈSE

*présentée à la Faculté des Sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences, mention biologique*

par

Naz DOLATSHAHI-MISSAGHIEH
TEHERAN-IRAN

Thèse N° 1928

GENÈVE
Imprimerie Nationale
1979

La faculté des sciences, sur le préavis de Messieurs G. TURIAN, professeur ordinaire et directeur de thèse, J. MIEGE, professeur ordinaire (directeur du Dpt de biologie végétale) et I. KAPETANIDIS, professeur extraordinaire (Section de Pharmacie) autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 9 août 1979

Le doyen :
Bernard LEVRAT

Thèse N° 1928



Je tiens à remercier Monsieur le Professeur G. Turian, du Laboratoire de Microbiologie générale qui a pris l'initiative de diriger ma thèse, pour l'intérêt qu'il lui a porté dans sa spécialité et pour son effort de coordination des trois parties successives.

Mes remerciements vont également aux Professeurs J. Miège et I. Kapetanidis pour les précieux conseils qu'ils m'ont prodigués dans leurs spécialités respectives.

Ma reconnaissance va aussi à Monsieur le Professeur A. Eghbali du Département de Microbiologie et de Parasitologie médicale de la Faculté de Médecine de l'Université Nationale d'Iran pour ses encouragements et son aide pendant toute la durée de ma recherche en Iran, ainsi qu'aux Professeurs Bijan et Hemmati pour m'avoir permis de travailler dans leurs laboratoires.

Ma gratitude va à Monsieur le Professeur Rustayan et à Mademoiselle Niknejad de la Faculté des Sciences de l'Université Nationale d'Iran pour leur aide lors de la détermination du principe actif.

Mes remerciements également à Monsieur le Professeur K.H. Rechinger du Conservatoire de Botanique de Vienne pour ses conseils lors de la détermination de la sous-espèce Centaurea belangeriana ainsi qu'à Monsieur Wust et à Madame Lacotte du Laboratoire de Chimitaxonomie pour les préparations des photos à microscopie à balayage et à Mademoiselle Martin pour la dactylographie.

Mes pensées vont aussi à mon mari et à mes enfants pour la patience et la gentillesse qu'ils m'ont témoignées pendant ce travail.

A mes parents

A mon mari et à mes enfants

TABLE DES MATIERES

Introduction générale	1
Antibiotiques des plantes supérieures	3
But de cette recherche	5
Valeur utilitaire des Compositae	6

PREMIERE PARTIE : BOTANIQUE

Chapitre I

Etude de *Centaurea belangeriana* (DC) Bornm

Introduction et position systématique	13
Synonymie	14
Diagnose	15
Répartition géographique	16
Ecologie	19
Obtention de la plante	19
Morphologie macroscopique	20
Morphologie microscopique	23
Mensuration de la taille des grains de pollen	26
Histologie	27
Nombre de chromosomes somatiques	30

Chapitre II

Conclusion	32
Photographies	33

DEUXIEME PARTIE : ETUDE PHYTOCHIMIQUE

Chapitre I

Introduction	45
------------------------	----

Chapitre II

Isolement et identification de la cnicine	48
---	----

Chapitre III

Conclusion	55
----------------------	----

TROISIEME PARTIE : MICROBIOLOGIE

Effet antibiotique de la cnicine sur les micro-organismes
de nature végétale et animale

Introduction	58
------------------------	----

Chapitre I

Activité antibactérienne	59
------------------------------------	----

Bactéries expérimentées	60
-----------------------------------	----

Matériel et méthodes	67
--------------------------------	----

Discussion	68
----------------------	----

Planches	72
--------------------	----

Chapitre II

Activités antifongiques

Matériel et méthode	78
-------------------------------	----

A) Etude de l'activité sur les champignons levuriformes	79
---	----

I) Activité in vitro	79
--------------------------------	----

II) Activité in vivo	81
--------------------------------	----

B) Etude de l'activité sur les champignons filamenteux	81
--	----

Résultats	81
---------------------	----

A) Champignons levuriformes	81
---------------------------------------	----

b) Champignons filamenteux	82
--------------------------------------	----

Discussion	101
----------------------	-----

Chapitre III

Activité sur les protozoaires

Matériel et méthode	103
Test de toxicité in vivo	104
Conclusion	106
Conclusion générale	107
 Bibliographies	 108
Bibliographie de la partie botanique	109
Bibliographie de la partie phytochimique	111
Bibliographie de la partie microbiologique	114

INTRODUCTION GENERALE

La vertu des plantes est un fait indiscutable et si l'homme savait se servir des plantes, il n'aurait pas besoin d'avoir recours aux médecins. Paracelse (1493-1541) constatait : que les pâturages et les collines sont des pharmacies.

Dans l'antiquité certaines plantes étaient renommées pour des vertus qu'on leur avait reconnues. Personne ne cherchait à savoir pourquoi ou comment elles agissaient, mais c'était un fait incontesté et qui paraissait magique. La science moderne en analysant et étudiant les effets thérapeutiques des plantes n'a pas pour but de diminuer cette confiance en la nature, mais elle veut préciser, comparer et classer les diverses propriétés pour grouper les plantes à effets similaires, choisir les plus efficaces et les faire connaître.

Déjà, 5000 ans avant notre ère, les civilisations sumériennes, assyriennes et perses utilisaient les plantes pour traiter les malades et les Chaldéens avaient une thérapeutique exclusivement végétale.

Les Indiens traitaient déjà les diarrhées et les fièvres en se servant des remèdes spécifiques au paludisme et la dysenterie amibienne par la quiquina et l'ipécacuanha.

Dans la Perse antique, le livre, l'Avesta, rapporte quelle était l'utilisation des épices comme thérapeutique. Les plantes à essences avaient un rôle de purification.

Les Egyptiens connaissaient les propriétés bactéricides et antiseptiques des plantes et ils conservaient leurs morts par la momification et à l'aide de l'hysope et du thymn. Ils utilisaient l'ail et l'oignon à cause de leurs pouvoirs thérapeutiques.

Les Arabes jouèrent dans ce domaine un rôle important : ils firent connaître à l'Europe les denrées de la Chine et des Indes. Ils possédèrent longtemps le monopole des épices dont ils utilisaient depuis de longue date les propriétés thérapeutiques.

Les Arabes inventèrent le sirop des cinq racines : fenouil, persil, petit houx, asperge et hache. Ils se servaient du clou de girofle dans la pommade ophtalmique, le kohl, toujours en usage de nos jours.

Les premiers livres sur les plantes médicinales furent écrits par Avicenne, philosophe et médecin iranien de l'an 1000, qui est demeuré fort célèbre.

Certes, depuis l'antiquité, le chemin parcouru est grand. Le fait de pouvoir isoler, purifier et cristalliser les principes actifs a permis aux chimistes d'en connaître la constitution par une analyse précise, puis de les reconstituer (synthétiser) à partir d'éléments simples qui sont devenus la base de bien des médicaments chimiquement éprouvés et reconnus pour leur action précise : soit l'amélioration de l'état du patient, soit la suppression de la cause de sa maladie.

ANTIBIOTIQUES DES PLANTES SUPERIEURES

La découverte de la pénicilline comme métabolite des diverses espèces de *Penicillium* par A. Fleming, à la fin des années 20, a donné lieu à une recherche intensive dans les domaines des antibiotiques se trouvant dans les plantes inférieures, les bactéries et les champignons. Ces travaux ont conduit à la découverte d'une série d'importants médicaments sans lesquels la thérapie moderne n'est plus concevable.

Cependant on s'est peu occupé des mécanismes de défense des plantes supérieures contre les attaques virales ou fongiques et bactériennes, quoiqu'ils existent sans aucun doute.

Principalement la question de savoir si les substances actives à faible poids moléculaire causent des effets antibiotiques n'a trouvé que quelques réponses occasionnelles. La raison en est peut-être que ces substances actives sont formées pour la plupart à partir des précurseurs inactifs, auxquels se mêlent les processus fermentatifs. Seulement à la jonction des précurseurs inactifs avec les ferments spécifiques, causés par lésion du tissu des plantes, l'antibiotique est formé. De cette façon l'allicine (A. Stoll) de l'ail se forme à partir de l'alliine et du ferment allinase.

La question de la résistance de certaines bactéries aux antibiotiques provenant des micro-organismes et le besoin thérapeutique pour les nouveaux agents antifongiques, antiviraux, et antiprotozoaires ont incité les chercheurs à étudier les antibiotiques éventuels se trouvant chez les plantes supérieures.

L'utilisation par l'homme, depuis des siècles, des différentes parties des plantes à cause de leurs effets curatifs fut aussi une raison pour les chercheurs de trouver le principe actif et sa localisation ainsi que son effet biologique, à partir des plantes supérieures.

Les études faites sur ce sujet à partir des années 40-67 par les méthodes phytochimiques ont montré qu'il existe des groupes de plantes vasculaires contenant des antibiotiques et qu'une fois purifiées on peut déterminer leur potentiel d'activité pour les

micro-organismes in vitro et in vivo et voir si ces agents par leurs structures chimiques largement différentes de celles des antibiotiques des plantes inférieures peuvent jouer un rôle dans le traitement anti-infectieux humain.

Les antibiotiques des plantes sont en partie assez instables et se modifient vite en perdant leurs activités et ces conditions rendent les recherches sur les antibiotiques très difficiles parce que leurs résultats dépendent des circonstances dans lesquelles les essais ont été effectués.

Le Dr. Schonbeck (1967) de l'Institut de Pathologie Végétale à Bonn travaille principalement avec les parties individuelles des plantes fraîches et de 140 espèces différentes une activité antibiotique a été détectée en 83% des cas et ceci pour 29% contre les bactéries, pour 13% contre les champignons et pour 40% contre les deux groupes en même temps. Ce sont ces fleurs surtout qui montrent une grande activité, suivies par les feuilles, les racines et les tiges. La plupart des antibiotiques des plantes n'ont pas de sélectivité entre les micro-organismes pathogènes et les cellules de l'hôte et ils peuvent donc être aussi toxiques pour celui-ci. La plus grande valeur donnée à un antibiotique est déterminée par sa toxicité sélective pour les micro-organismes.

Le mode d'action de la plupart des antibiotiques isolés des plantes n'est pas clair à l'exception de quelques uns : les alcaloïdes, saponines, huiles volatiles, polyacétylènes, lactones sesquiterpéniques. De ce fait une division biologique n'est pour l'instant pas possible.

Leurs structures chimiques sont assez différentes de celles des antibiotiques des plantes inférieures, mais grâce à des recherches intensives réalisées dans le monde, nous avons l'espoir de pouvoir trouver des antibiotiques aussi précieux que la tétracycline, la pénicilline, etc.

But de cette recherche

Du fait de la fréquence assez considérable des plantes médicinales en Iran et surtout du fait que la famille des Compositae est très connue au point de vue économique et pharmacodynamique et en raison de l'utilisation des différentes espèces de cette famille dans la médecine traditionnelle, et en tenant compte également des recherches poussées faites ces dernières années en botanique - localisation des produits actifs élaborés par ces plantes, comme les lactones sesquiterpéniques, leur biosynthèse dans les plantes et l'étude phytochimique d'identification de ces produits actifs et leurs effets pharmacodynamiques - nous sommes intéressés à consacrer cette thèse à l'étude d'une espèce de Compositae :

Centaurea belangeriana DC qui se trouve dans les régions désertiques de l'Iran et également dans la région de Téhéran. Elle est utilisée par les gens du pays comme un remède contre les diarrhées et les infections gangréneuses, comme expectorant, anti-inflammatoire et aussi comme fébrifuge.

Outre l'étude des valeurs utilitaires des Compositae, nous avons essayé de présenter une morphologie macro et microscopique de cette plante, et mis en évidence ces glandes sécrétrices, étude qui constitue l'essentiel de la partie botanique de notre travail.

Nous avons ensuite étudié les méthodes phytochimiques d'extraction, de purification et d'identification des lactones sesquiterpéniques, ainsi que leurs propriétés et nous avons pu identifier le principe actif, la cnicine, par la méthode de Mabry (1969).

Enfin, nous avons examiné les effets antibiotiques de cette substance sur les micro-organismes et sa toxicité sélective, afin de pouvoir démontrer son utilité dans les domaines du traitement des maladies infectieuses.

Valeur utilitaire des Compositae

Les Compositae étant très anciennement apparues sur le globe, la connaissance de leur importance pharmaceutique et économique est aussi très ancienne. Car, l'utilisation à des fins thérapeutiques d'un certain nombre de ces plantes se pratiquait depuis l'antiquité. Leur importance économique a été également reconnue depuis longtemps dans différents domaines industriels. Ainsi, les Compositae avaient toujours attiré l'attention des chimistes, à toutes les époques et grâce aux progrès de la chimie dans ces dernières années, un grand nombre de substances sont isolées.

Nous allons donner quelques détails sur des substances déjà isolées à partir des Compositae.

Tableau 1 - Substances isolées à partir des Compositae
(d'après J.B. Heywood, 1977)

NOMS DES SUBSTANCES	LOCALISATIONS	ACTIVITES
Acides gras	Akène	-
Alcaloïdes (Pyrrolizidines)	feuille	Toxique
Cnicine	feuille-tige	antitumorale
Chromène	feuille-racine	antibactérienne
Costunolides	-	insecticide
Coumarine	feuille-fleur	antitumorale
Cyclitols	feuille	-
Eléphantine-Eléphantopine	-	-
Esters d'acide Caféique	-	antitumorale
Flavonoïdes	feuille	diurétique
Glycosides cyanogénétiques	feuille-fleur	-
Huiles essentielles	feuille-fruit	-
Inuline de type fructane	feuille-fruit	toxique
Lactucine, Lactopicine	organes de réserve	-
Phantonoline	-	-
polyacétylènes	-	sédative
Polyisoprènes	-	hypoglycémiant
Polysaccharides	-	antitumorale
Santonine	-	antimicrobienne
Saponines flavonols	-	antimicrobienne
Sesquiterpènes-lactones	racine-feuille	-
Terpénoïdes	racine-tige	-
Vernomygdine	-	-
	feuille	expectorante
	feuille	anthelminthique
	-	spasmodique
	-	Cytotoxique
	-	-
	-	antitumorale
	-	antimicrobienne

Tableau II Substances isolées à partir des Cardueae

CLASSE DES SUBSTANCES	NOM DES SUBSTANCES	ACTIVITES
Polyacétylène	Oxyde de carlina	Antibiotique
Terpénoïde	Cnicine	Antimicrobienne
	Costunolide	Cytotoxique
	Atractyloside	Toxique
Composés phénoliques	Cynarine	Chlolerétique
	Silymarine	Antihépatotoxique

Tableau III Terpénoïdes isolées à partir des Centaureinae

Espèces végétales	Nom de substances
Carthamus tinctorius	Dihydroxyprégnène-3 1 Cellobioside
Centaurea scabiosa	Scabiolide
Centaurea salonitana	Salonitéolide
Centaurea solstitialis	Salstitialis
Centaurea hyrcania	Acrophiline
Centaurea calcitrapa	Cnicine
Centaurea diffusa	Cnicine
Centaurea maculose	Cnicine
Cnicus benidictus	Cnicine
Centaurea arbutifolia	Triterpène
Centaurea melitensis	Melitensine

Importance pharmacodynamique et économique de certaines substances isolées à partir des Compositae

a) Substances antiphlogistiques et spasmolytiques

Camomille ou Marticaria chamonilla est une plante dont l'importance pharmaceutique est connue depuis longtemps. L'~~abisabolol~~ abisabolol est une sesquiterpène alcool isolée de cette plante qui exerce un effet antiphlogistique. La pétastine est une terpénoïde extraite des feuilles et de la racine de Petasites hybridus dont le pouvoir anticonvulsif est quatorze fois plus fort que celui de la papaverine.

b) Substances antihépatotoxiques et cholérétiques

Silybine est une substance extraite de Silybum marianum qui a des activités antihépatotoxiques. Elle exerce une activité protectrice contre la phalloïdine par le blocage de l'effet de la toxine sur les récepteurs spécifiques de la membrane cellulaire. Depuis l'antiquité, l'artichaut ou Cynara scolymus a été utilisé comme hépatoprotecteur et cholérétique en médecine traditionnelle de différents pays. La cynarine est une substance extraite de l'artichaut dont l'administration stimule la sécrétion biliaire. Ainsi, il est facile de comprendre la raison pour laquelle on traitait autrefois les malades atteints de jaunisse par administration de l'artichaut.

c) Substances antimicrobiennes (bactéries, champignons)

L'activité antimicrobienne de la plupart des membres de la famille des Compositae est liée à la présence de dérivés polyacétyléniques dans leur structure chimique. La capilline extraite d'Artemisia capillis et l'oxyde de Carline provenant de Carlina acaulis sont actifs à la dilution de 1:200,000 sur des Staphylococcus aureus, Salmonella typhi et paratyphi et Shigella dysenteriae. La Capilline est également active sur les champignons. L'utilisation de ces substances dans la thérapeutique est assez limitée de par leurs instabilité et toxicité.

d) Substances cytotoxiques

Certaines sesquiterpènes lactones de type germacranolide, guaianolide, pseudoguaianolide et élémanolide ont montré des activités cytotoxiques et cancérostatiques. Ces produits sont actifs contre certaines tumeurs comme les carcinome de walker, Sarcome 256, Melanome B16, Carcinome du nasopharynx de cellules KB et une Leucémie murine. L'activité antitumorale de ces produits est liée à la présence du groupement α -méthylène dans l'anneau de la gamma lactone.

e) Substances édulcorantes

Le Stévioside est un diterpène-glycoside provenant d'une plante appelée Stevia rebaudiana, dont le pouvoir édulcorant est 300 fois plus fort que celui du saccharose et 50 fois moins fort que celui de la saccharine. Le stévioside remplaçait pendant la guerre le sucre ordinaire. Les effets secondaires de cette substance ne sont pas encore élucidés.

f) Substances amères

Les substances amères se trouvent largement chez les plantes des Compositae, mais l'importance économique d'Artemisia absinthium et de la Cnicus benedictus est plus grande. Le goût amer de l'absinthe est dû à la présence d'une guaiano-
lactone qui est appelée absintine. L'absintine provoque l'hypersecretion des glandes salivaires et en exerçant un effet inhibiteur sur l'activité de l'amylase, est à l'origine de l'accumulation des hexasamines. La consommation prolongée de l'absinthe peut à la longue aboutir à l'intoxication. C'est la raison pour laquelle certains pays comme l'Allemagne, la France et la Suisse ont interdit par la loi la fabrication de liqueurs aromatisées par cette plante.

La saveur de Cnicus benedictus est liée à la présence de la cnicine, du type germacranolide. Le degré d'amertume de la cnicine est moins fort que celui de l'absinthine (800-1500 au lieu de 70'000). La cnicine est apte à exercer une action stimulante sur les sécrétions gastriques. Elle peut également exercer une action sur le péristaltisme intestinal.

g) Substances aromatiques

Les plantes aromatiques de la famille des compositae ne sont pas nombreuses. Cichorium intybus ou la chicorée peut être mélangée au café. Heliantus tuberosus remplace parfois des pommes de terre dans le repas.

h) Substances Polysaccharidiques

La teneur en Inuline de certains membres de cette famille comme Inula Sp et Arctium lappa est considérable. Elle est utilisée dans la préparation du pain régime pour les diabétiques.

i) Substances insecticides

Les pyréthroïdes sont des substances extraites à partir de certaines Composées comme Chrysanthemum cinerariaefolium qui montrent des activités insecticides.

Musca domestica (la mouche domestique) est très sensible à l'action insecticide des pyréthrines I et II. Le mélange des pyréthrines avec des substances anti-oxydantes est couramment utilisé car les matières oxydantes exercent un effet dégradant sur ces insecticides. La présence des pyréthoïdes chez certains membres des compositae semble leur procurer un moyen de défense naturel contre l'envahissement par les insectes.

P R E M I E R E P A R T I E

BOTANIQUE

C H A P I T R E I

ETUDE DE CENTAUREA BELANGERIANA (DC) BORNM

- Introduction et position systématique
- Synonymie
- Position systématique
- Répartition géographique
- Ecologie
- Obtention de la plante
- Morphologie macro et microscopique
- Mise en évidence des glandes sécrétrices
- Mensuration de la taille des grains de pollen
- Histologie
- Détection du nombre de chromosomes
- Conclusion

Introduction et position systématique

De nombreux représentants iraniens de la famille des Compositae (=Asteracées) renferment des huiles essentielles qui sont utilisées, grâce à leurs vertus pharmaceutiques, dans la médecine traditionnelle de ce pays. Parmi les espèces utilisées, nous nous sommes arrêtés à l'étude de Centaurea belangeriana dont les populations des campagnes se servent pour stopper les diarrhées microbiennes (en infusion), pour guérir les plaies (par application locale), comme vermifuge et fébrifuge (infusion).

Cependant, avant d'examiner les propriétés phytochimiques et antibiotiques nous décrirons les principaux caractères botaniques de cette plante en la situant tout d'abord à l'intérieur de la famille.

Centaurea belangeriana relève de la tribu des Cynarea (Cardue = Cynaroidae). Cette tribu est divisée selon de Candolle 1838, Benthams 1873, Boissier 1875, 1846, en quatre sous-tribus qui sont :

- Echinopsidinae, cass.
- Carlininae, cass.
- Carduinae, Dumort.
- Centaureinae, Dumort.

Les sous-tribus des Carduinae et des Centaureinae diffèrent des deux autres par l'existence d'étamines hérissées de poils.

L'espèce envisagée appartient à la sous-tribu des Centaureinae.

Synonymies

Centaurea belangeriana (DC) Bornm. ex. Rech. f., Symb.

Afgh 2 : 181 (1955) est encore connu sous les dénominations suivantes :

- Basonyme : Tétramorphae belangeriana DC . Prod. 6 : 609 (1838)
- Centaurea phyllocephala Boiss. Diagn. Ser. I(6) : 134 (1843) ("1845")
- Parsa (Flore de l'Iran, vol. 3 : 687, 1946), en fait la variété persica de C. phyllocephala nom illégitime.
- Il y a également confusion entre les espèces C. belangeriana (DC) Bornm. et C. bruguieriana (DC) Hand-Mazz (in Ann. nat. Hofmus. Vienne 27 : 45 (1913)).

Cette dernière espèce avait été baptisée par A.P. de Candolle : Tetramorphea bruguieriana DC.

Certains auteurs ont considéré (Bornm. ex. Rech. f. Symb. Afgh 2 : 181 (1955) C. belangeriana comme une sous-espèce de C. bruguieriana (DC) Hand Mazz ; sous-tribu des Centaureinae, tribu des Cardueae, famille des Compositae.

Dans la littérature des erreurs de transcription tiennent au fait que certains botanistes ont désigné cette plante sous le nom de C. belangerana au lieu de C. belangeriana (Flora of Turkey vol. 5. 546 (1975)).

La différence entre les espèces belangeriana et bruguieriana est la suivante :

Centaurea bruguieriana (DC) Hand Mazz (typique) possède des cils de 1-3 mm de longueur sur les bords de ces bractées. (Anatolie orientale, Syrie, Iraq, Perse occidentale)

Subsp. belangeriana (DC) Bornm possède des cils de 0,3-0,5 mm (moins de 1 mm de long).

(Transcaucasie, Iran, Afghanistan, Beluchistan, Asie Centrale)

Diagnose

Caractérisations générales de cette sous-espèce telles qu'elles sont données par A.P. de Candolle :

T. Belangeriana, foliis infer...

Caulinis rameisque amplexicaulibus Cordatis obtusis dentato - Ciliatis, Super-Ionibus apiculatis, bracteis involucrique appendicibus dentato - Crispis ciliatis - in Persiâ legit cl. Belanger. Herba priori valdè affinis sed elatior, rami florales magis elongati, capitula minora magis distantia, spinæ invol. breviores 6 nec 9 lin longae, etc..

A.P. de Candolle Prodr. Syst. Nat. 6 : 609 - 1838

Répartition géographique en Iran et dans les pays voisins :

Nous avons pu établir une carte de distribution géographique de cette plante et *C. bruguieriana* en Iran et dans les pays voisins. L'établissement de cette carte est basé, d'une part, sur des recherches bibliographiques et, d'autre part, sur les documents existant dans l'herbier du Ministère de l'Agriculture en Iran et l'herbier du Conservatoire de Botanique de la ville de Genève. Nous avons complété ces informations par des observations que nous avons faites dans la région de Téhéran comme par exemple "Saadat-Abad" et "Ewine" (voir carte annexée).

La répartition géographique de Centaurea belangeriana (DC) Bornm
et Centaurea bruguieriana (DC) Hand-Mazz en Iran et dans les pays
voisins

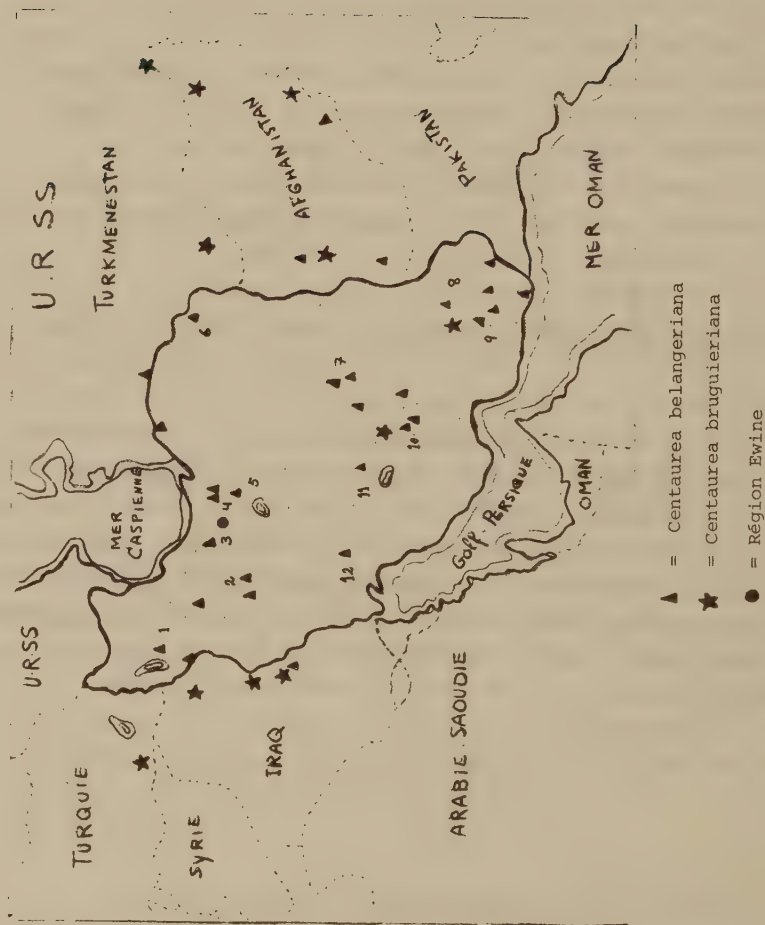


TABLEAU 1 - REGIONS D'IRAN OU C. BELANGERIANA A ETE RECOLTE
ET LEURS CARACTERISTIQUES CLIMATIQUES PRINCIPALES
(ces dernières d'après Sabeti H., 1969)

Indice xérothermique = X c'est-à-dire le nombre de jours
biologiquement secs par an (Gaussen)

Moyenne de la pluviosité annuelle = P (par mm)

Nom de la région	P	X	Climat
1) Azarbaïdjan	327,6	120	Thermo-méditerranéen
2) Hamadan	347,6	151	Steppique froid
3) Varamin	114,6	211	Désertique
4) Téhéran	250,4	199	Désertique
5) Ghom	139	233	Désertique
6) Turkamani	236,2	168	Thermo-méditerranéen
7) Kerman	183	221	Désertique
8) Beluchistan	85,6	296	Désertique
9) Iranchahr	83,6	300	Désertique
10) Bam	72	341	Subdésertique
11) Luristan	334,8	199	Thermo-méditerranéen
12) Kousestan Aghadjani	316	121	Xérothermo-méditerranéen

La plupart de ces régions se caractérisent par leur climat de type désertique.

STATIONS ET REGIONS OU ONT ETE DECOUVERT

▲ C. BELANGERIANA ET C. BRUGUIERIANA ★

(pays voisins de l'Iran)

Pays	Région
Afghanistan	▲ Farah - Qariya i Til Kamand ▲ Farah - Sherzad ▲ Ghandehar ★ Hari-rud vallée ★ Kapica - Panfir-Tal - Kekhwak-Tal ★ Ghandehar ★ Kabul
Iraq	▲ Mossoul ★ Kerkuk ★ Mésopotamie entre Mossoul et Bagdad ★ Baiji et Mossoul ★ Assyrie orient. Ankova
Turkmenistan	★ Vallée Sarawshan
Iran	★ Luristan - Bisheh et Khorramabad ★ Beluchistan - Quetta - Chaman

L'examen du tableau ci-dessus indique que les aires de C. belangeriana et de C. bruguieriana sont en grande partie superposées ou sympatriques

Les aires communes sont pour :

Iran : Luristan et Beluchistan

Afghanistan : Ghandahar et Farah Qariya

Iraq : Mossoul et Bagdad

Ecologie

Centaurea belangeriana est une plante annuelle dont la taille varie selon les conditions écologiques : température, altitude, humidité et nature du sol. Le cycle végétatif se déroule dans les limites de la température allant de 20 à 30° C. C'est un xérophyte qui se développe grâce aux rosées ou avec un minimum de pluies ou encore grâce à l'humidité édaphique. Il croît dans les régions où l'altitude varie entre 800 et 1200 mètres, sur des sols pauvres et ordinairement calcaires.

Dans les régions d'Ewine et de Saadat-Abad la densité des individus est de l'ordre de 2-3 par m². Les principales plantes compagnes trouvées au voisinage de Centaurea belangeriana appartiennent aux genres et espèces suivants : Carthamus oxyacantha, Echinops sp, Centaurea jacea et Onopordon leptolepis. Cette plante se trouve dans la nature à partir du mois d'avril et poursuit son cycle jusqu'au début de l'hiver. Les fleurs apparaissent durant les mois de juin, juillet et août. Les akènes mûrissent au mois de septembre. En hiver, la plante se dessèche et disparaît.

Obtention de la plante

La récolte des échantillons a été faite au cours des mois de mai-juin. L'arrachage des plantes se fait assez facilement à l'aide d'une pelle. Les échantillons ainsi obtenus sont étiquetés. L'étiquette porte les renseignements suivants : date et lieu de récolte, nom du collecteur. Ces échantillons sont placés dans des sacs en matière plastique et seront ensuite envoyés au Laboratoire. Arrivés au Laboratoire, une partie sera destinée à l'étude botanique et l'autre partie sera soumise à l'extraction chimique.

Environ 160 échantillons botaniques ont été étudiés au cours du cycle végétatif de la plante c'est-à-dire d'avril à octobre.

Morphologie

Outre la morphologie macroscopique, nous avons étudié la morphologie microscopique. Cette dernière a été faite à la fois par la microscopie optique et par le microscope électronique.

Morphologie macroscopique

L'étude macroscopique a porté sur la plante entière (racine, plantule, tige, feuille, bouton, fleur, akène) (fig. 1)

La germination est épigée. La plantule présente 2 feuilles cotylédonaire épaisses, charnues et entières. Les 2 premiers rameaux latéraux naissent à l'aisselle des cotylédons. Par la suite les ramifications sont de type dichasial. Les capitules apparaissent à l'extrémité des branches terminales (fig. 2).

Racine

La racine longue d'environ 20 centimètres, de couleur brune, est pivotante et n'offre aucune ramification, seules quelques radicules s'observent sur le tronc.

Tige

La tige de couleur blanchâtre et fortement ramifiée, est recouverte de duvets. Sa hauteur maximale varie de 20 à 60 centimètres.

Feuille

Les feuilles sont de deux sortes :

- 1) Des feuilles grandes et longues de 10 cm, présentent de grandes échancrures et elles sont disposées en rosette au pied de la tige. Elles forment une sorte de tapis vert à la surface du sol. Ces feuilles comme la tige sont duveteuses. Ces feuilles sont les premières à apparaître, elles se flétrissent vite, et disparaissent rapidement, dès le mois de mai (fig. 3). Ces feuilles sont en forme pinnatiséquée.

- 2) Des feuilles petites qui s'insèrent de façon alternée sur la tige. Leur taille diminue le long de la tige du bas vers le sommet. Le bord de ces feuilles est dentelé et leur partie basale est engainante. La taille de ces feuilles varie de 1-3 centimètres et leurs surfaces supérieure et inférieure sont recouvertes de duvets (fig. 4).

Boutons floraux

Les boutons floraux apparaissent au sommet de certaines ramifications terminales et sont caractérisés par une masse plus ou moins dense portant cinq épines longues et blanchâtres. A l'intérieur de ces boutons, les organes reproducteurs de la plante se trouvent à l'état immature. L'étude topographique des boutons nous a permis de distinguer l'existence d'involucres formés de plusieurs rangées superposées de pièces.

La rangée la plus externe est constituée de feuilles minuscules (bractées) à bords dentelés et porteurs de cils longs de 0,3-0,8 mm. L'insertion de ces feuilles sur le réceptacle se fait par un prolongement membraneux concave (fig. 6).

L'importance taxonomique des bractées est très grande, car en tenant compte de leur taille et de la longueur des poils existant sur leurs bords, il est possible de faire la diagnose différentielle de C. belangeriana et de son espèce très voisine C. brugueriana.

Au dessous se trouvent deux rangs de bractées possédant chacune à son extrémité apicale une épine. La longueur de chaque bractée avec son épine est d'environ 2 centimètres.

La quatrième rangée est formée de bractées dont l'extrémité apicale porte une épine courte et fragile (la dimension de ces bractées est de 4-5 mm sur 3 mm) (fig. 7).

Les rangées suivantes sont constituées de bractées en forme d'écailles vert-violacées.

Les rangées les plus internes sont formées d'écailles fines et transparentes.

La cavité réceptaculaire est emplie de poils qui couvrent et protègent les fleurs immatures.

Fleur

Le capitule présente deux types de fleurs : les fleurs périphériques stériles et les fleurs centrales hermaphrodites (fig. 8).

- Fleurs périphériques (stériles)

Elles sont tubuliflores et leur extrémité libre est divisée en deux, trois ou quatre lobes de couleur violet pâle, leur longueur ne dépasse pas 9 mm.

- Fleurs centrales (fertiles)

Ces fleurs également tubuliflores ont un aspect en $\S$ plus ou moins allongé. La partie tubulaire des fleurs renferme une partie gonflée en forme d'une protubérance. L'extrémité libre des fleurs présente cinq lobes de couleur violette. L'extrémité inférieure des fleurs se repose sur l'extrémité apicale de l'akène (fig. 9 et 10).

La dissection de ce deuxième type de fleurs (fleurs centrales) sous une loupe binoculaire nous a permis d'étudier leurs organes reproducteurs (fig. 11) dont la morphologie est la suivante :

Étamines

Les étamines sont au nombre de cinq. Comme chez toutes les Compositae les filets sont soudés entre eux pour former un tube permettant le passage du pistil. La partie basale des filets présente quelques pilosités latérales et les anthères sont en forme de flèche (fig. 12).

Pistil

Le pistil est formé de deux parties : une partie tubulaire très grêle et un stigmate. La partie médiane du pistil forme une protubérance hérissée de poils dressés en direction du stigmate. La longueur du pistil est supérieure à celle des étamines, et le stigmate est bifurqué (fig. 13).

Akènes

Les akènes longs de 3 mm, de couleur brunâtre sont coniformes. Leur partie supérieure est dentée et porte trois rangées de pappus de différentes tailles et formes. L'un des bords latéraux des akènes à l'extrémité inférieure présente une petite partie concave : le hile (fig. 14).

Morphologie microscopique et mise en évidence des glandes sécrétrices

L'étude microscopique de la morphologie a été faite sur des parties disséquées et non-disséquées de la plante. L'éclaircissement des préparations a été réalisé dans la solution Marc André et leur montage entre lame et lamelle a été fait au baume de Canada.

Nous présentons ci-dessous la formule de la solution

Marc André :

Hydrate de chloral	40 g
Acide acétique	30 cc
Eau	30 cc

Tige

L'étude microscopique des duvets recouvrant la surface de la tige a montré des poils simples cloisonnés dont les cellules basales sont plus volumineuses que les cellules apicales (fig. 15).

Feuille

En microscopie optique, les bords de la feuille ainsi que ses surfaces présentent une pilosité de structure tout à fait semblable à celle des duvets trouvés à la surface de la tige.

En microscopie électronique à balayage, les spécimens ont été examinés à sec, sans préparation préalable sinon d'être fixés au porte objet avec le l'argent colloïdal et d'être métallisés avec de l'or (épaisseur environ 500 Å).

Les surfaces foliaires montrent :

- 1) des poils simples non cloisonnés
- 2) des poils tubuliformes cloisonnés
- 3) des glandes pluricellulaires en massue pédicellées ou non.
(fig. 16).

Bractées

Par microscopie optique, les organes en massue pluricellulaires ont été également retrouvés sur les bords des bractées (fig. 17). Outre la présence de ces organes, l'examen microscopique a révélé dans le parenchyme des bractées la présence des cristaux rectangulaires (fig. 18) dont nous n'avons pu déterminer la nature chimique (traitement par acétone, chloroforme et alcool). L'extraction chimique des glandes des bractées a montré la présence du principe actif.

Boutons floraux

L'étude microscopique de la partie apicale du bourgeon a montré l'existence de glandes en massue, du même type que celles des feuilles et des bractées. L'extraction chimique a révélé la présence du principe actif (fig. 19).

L'aspect plus ou moins glandulaire de ces organes et le traitement par le mélange : chloroforme - acétone - éther et alcool permet de supposer qu'il s'agit d'organes sécréteurs de la plante étudiée. Nous verrons plus tard (partie phytochimique) que la fréquence de ces organes sécréteurs sur la feuille est en relation étroite avec la concentration maximale du principe actif que nous avons pu isoler à partir de l'extrait des feuilles.

Akènes

La microscopie à balayage a démontré que la surface des akènes n'est pas lisse mais qu'elle est recouverte de fines écailles. Les pappus sont en forme de plumes.

Grains de pollen

Sous le microscope à balayage, les grains de pollen en vue polaire apparaissent sphériques. Les sillons assez longs se rapprochent très près du sommet. En vue équatoriale les grains de pollen sont elliptiques.

Les mensurations ont été pratiquées sur 80 exemplaires et la moyenne de taille a été calculée de la façon suivante :

Taille des grains de pollen = X	Nombre d'individus = f	fx
7	9	63
6,5	6	39
6	26	156
5,5	14	77
5	20	100
4,5	3	13,5
4	2	8
-	N = 80	$\Sigma f x = 456,5$

$$\mu = \frac{\Sigma FX}{N} = \frac{456,5}{80} = 5,70$$

Le chiffre de 5,70 correspond à la moyenne de taille de 80 grains de pollen dont la mensuration a été faite au micromètre oculaire en combinaison avec l'objectif 40. En sachant que chaque division du micromètre oculaire dans ces conditions correspond à 3,45 microns, nous pouvons conclure que la taille des grains de pollen est de 19,68 microns. Ces grains de pollen appartiennent au type tricolopré (fig. 20).

Histologie

Les coupes transversales de la tige - anthère - grain de pollen - glandes sécrétrices - ont été préparées selon deux méthodes différentes : une méthode qui est habituellement utilisée en histologie végétale et une autre qui se pratique ordinairement en histologie animale.

a) Confection des coupes selon la technique utilisée en histologie végétale

Pour la préparation des coupes transversales de la tige, elle a été découpée en petits morceaux et fixée pendant vingt-quatre heures dans le fixateur suivant :

Alcool à 96°	40 volumes
Glycérine	40 "
Eau	20 "

Les morceaux de la tige ainsi fixés ont été ensuite coupés à l'aide d'une lame de rasoir neuve. Les coupes les plus minces ont été colorées d'une coloration usuelle en histologie végétale (carmin-bleu de méthylène). Selon cette technique de coloration le parenchyme et le liber se colorent en rose, tandis que les vaisseaux ligneux et le sclérenchyme prennent la couleur verte. Le collenchyme se colore en brun pâle.

L'étude microscopique de la coupe transversale de la tige a montré une couche cuticulaire à partir de laquelle sortent les poils sécréteurs. Sous la couche cuticulaire on observe une couche parenchymateuse renfermant des faisceaux libériens et ligneux (fig. 21).

b) Confection des coupes selon la technique utilisée en histologie animale

En utilisant cette technique, nous avons pratiqué des coupes transversales du bourgeon au niveau des anthères (fig. 22) afin d'obtenir une coupe des grains de pollen

et les organes sécréteurs en massue. La fixation a été faite dans un mélange d'acide acétique, d'alcool éthylique et de formol. Après vingt-quatre heures de fixation, les pièces ont été deshydratées en les passant des bains de formol à 10%, alcool à 96⁰, alcool absolu et xylol. Les pièces ainsi traitées ont été fixées dans des blocs de paraffine et coupées au microtome. La coloration des coupes après leur déparaffinage a été faite à l'hématoxyline-Erythrosine selon la technique classique. Suivant cette coloration, les noyaux se colorent en violet et le cytoplasme en rouge brique.

Les coupes des grains de pollen ayant été colorés par cette technique, ont montré la présence d'une couche épaisse externe (exine) fortement colorée et une couche interne (intine) plus mince et moins intensément colorée. Un cytoplasme dense emplit la cavité de cette double paroi (fig. 23). A ce grossissement aucune columelle n'a été visible ce qui est d'ailleurs signalé pour certaines sections du genre (Dittrich - 1977)

La coupe des organes sécréteurs en massue montre des cellules juxtaposées ne laissant aucun espace vide (fig. 24).

Détermination du nombre de chromosomes

La détermination du nombre de chromosomes de Centaurea belangeriana a été effectuée sur des méristèmes radiculaires.

a) Germination

Les akènes pour germer ne doivent pas être en état de dormance. Nous avons pu obtenir leur germination au cours du mois de septembre sur papier filtre en boîte de Pétri.

On dépose les akènes sur la surface humide du papier filtre et on recouvre la boîte de Pétri par son couvercle. L'incubation de la boîte de Pétri ainsiensemencée se fait à la température ordinaire ($18-20^{\circ}\text{C}$).

Les akènes germent quarante-huit heures à quatre jours après la mise en germination. Les écrasements sont effectués quand les racines mesurent 3 à 4 mm.

b) Pré-traitement

Le pré-traitement a été opéré à l'alphabromonaphtalène dans l'eau afin de favoriser la séparation des chromosomes. Les racines séjournent dans ce milieu pendant deux heures.

c) Fixation

Le but de la fixation est de tuer la cellule. Le fixateur est constitué de $1/4$ d'acide acétique et de $3/4$ d'alcool absolu. La fixation doit se pratiquer pendant vingt-quatre heures à la température ordinaire.

d) Coloration

La coloration se fait en deux temps. Dans le premier temps on pratique un mordantage tandis que la coloration proprement dite se fait au deuxième temps. La solution du mordant est constituée d'une solution d'acétate de fer dans du fixateur. Le temps nécessaire pour le mordantage varie de 20 minutes à deux heures. Le colorant est une solution acétique de carmin et la coloration se pratique par le trempage de l'extrémité de la racine subissant des traitements sus-dits dans le colorant pendant trente minutes. Il est possible d'accélérer la coloration par un chauffage doux pendant deux minutes.

e) Nombre de chromosomes somatiques

Les méristèmes une fois colorés sont écrasés entre lame et lamelle dans une goutte d'acide acétique. La préparation est ensuite examinée sous le microscope en utilisant l'objectif 100. On recherche les plaques équatoriales métaphasiques.

Nous avons déterminé $2n = 20$ chromosomes pour la plupart métacentriques (fig. 25). Cette observation confirme les comptages chromosomiques effectués par le russe Matveeva T.S., 1969.

C H A P I T R E I I

CONCLUSION

Conclusion

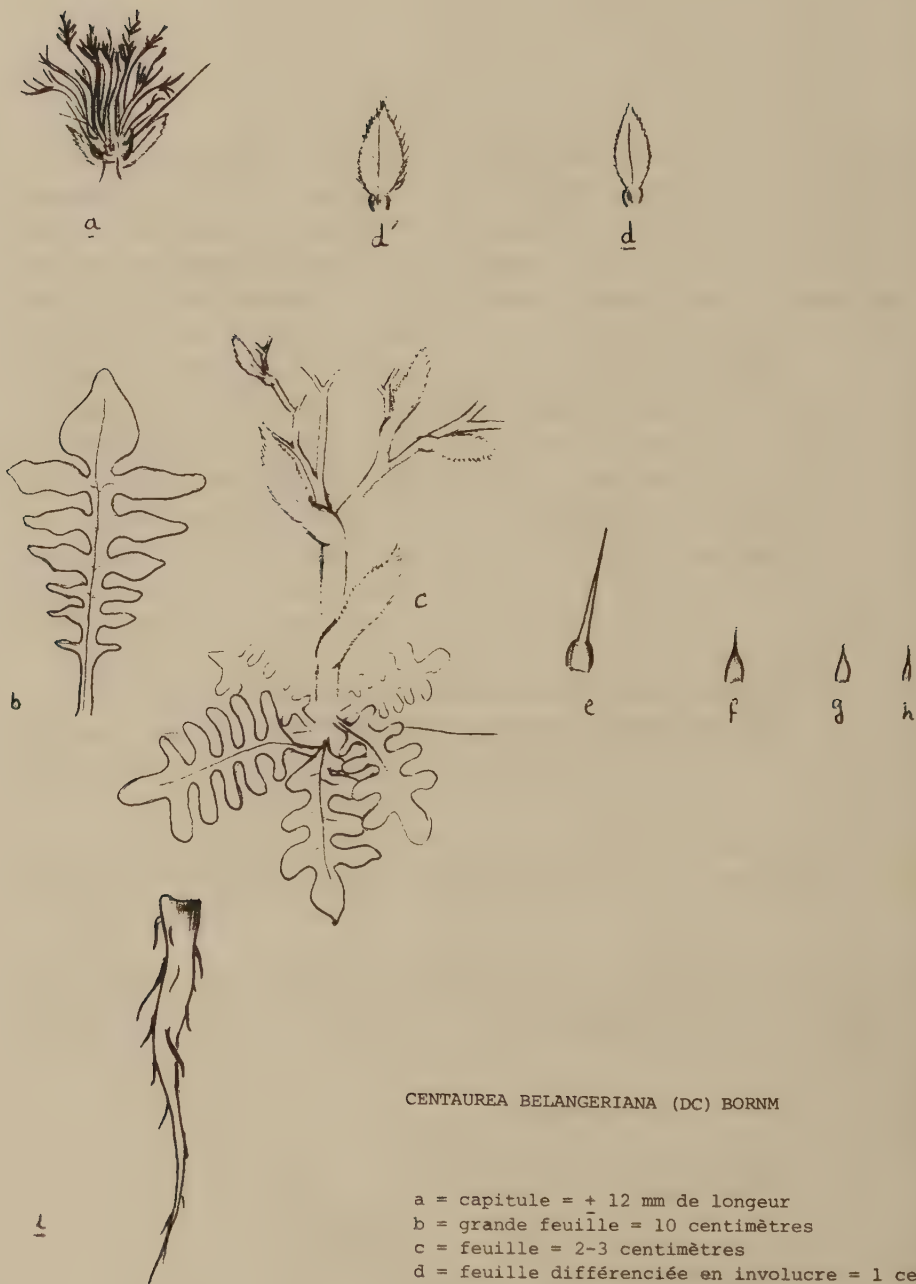
L'étude microscopique peut être très utile du point de vue de la taxonomie et de la morphologie des organes sécréteurs. L'apport de la microscopie en taxonomie permettra de distinguer des espèces macroscopiquement très voisines. L'étude microscopique des organes sécréteurs et puis la mise en extraction chimique des plantes munies de tels ou tels organes sécréteurs pourra éventuellement aboutir à la découverte d'une corrélation existante entre la morphologie des organes sécréteurs et la nature du principe actif isolé de la même plante. Dans ce cas, l'étude morphologique des organes sécréteurs orientera le chimiste dans ses recherches en lui permettant le choix des méthodes convenables. Certes la découverte d'une telle corrélation entre "morphologie-nature chimique du principe actif" demande de nombreuses recherches.

L'extraction chimique des parties isolées de la plante, racine, tige, feuille, fleur et akènes a montré que seule la racine ne contient pas de principe actif.

Le principe actif est synthétisé dans les cavités sous cuticulaires des poils sécréteurs de la feuille, tige, involucre, fleurs.

Les périodes auxquelles la concentration du principe actif élaboré par la plante est maximale correspondent aux mois de mai-juin.

PHOTOGRAPHIES DE LA PARTIE BOTANIQUE



CENTAUREA BELANGERIANA (DC) BORNM

- a = capitule = + 12 mm de longueur
 b = grande feuille = 10 centimètres
 c = feuille = 2-3 centimètres
 d = feuille différenciée en involucre = 1 centimètre
 e = involucre à grande épine blanche = 2 centimètres
 f = petite involucre = 1 centimètre
 g = écaille = 5mm
 h = écaille = 7mm
 i = racine = 9-20 centimètres
 d' = involucre de Centaurea bruguieriana



a + b = étamine
 c = stigmate
 d = achène
 e = fleur hermaphrodite
 f = fleur stérile
 g = bouton-fleur non mature



Fig. 1 - La plante (30 cm)

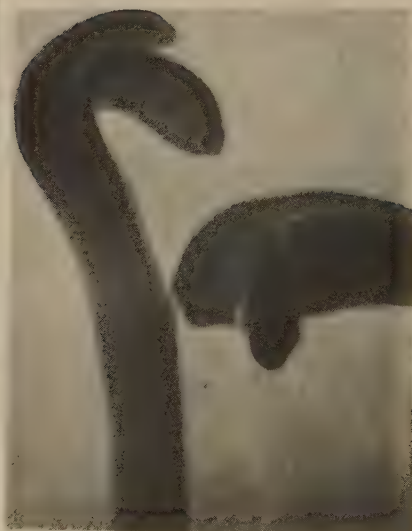


Fig. 2 - Plantule

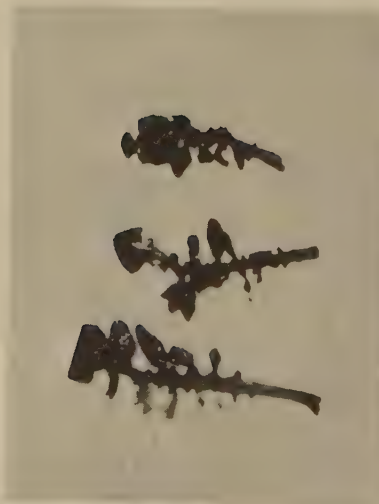


Fig. 3 - Grande feuille (10 cm)



Fig. 4 - Petit feuille (3 cm)



Fig. 5 - Bouton floral
(gross. X0,8)



Fig. 6 - Première rangée de bractées
(gross. X 8)

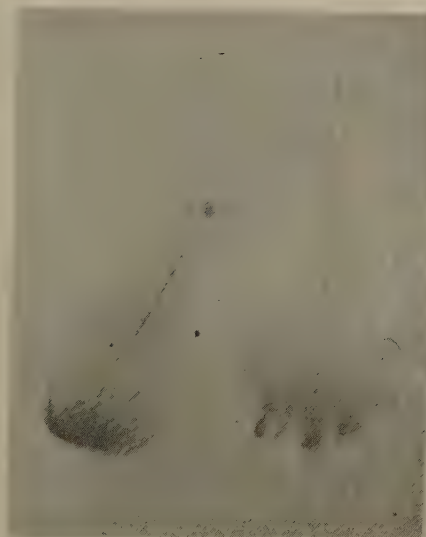


Fig. 7 - Les variétés de bractées
(gross. X0,8)



Fig. 8 - Capitule (12 mm)

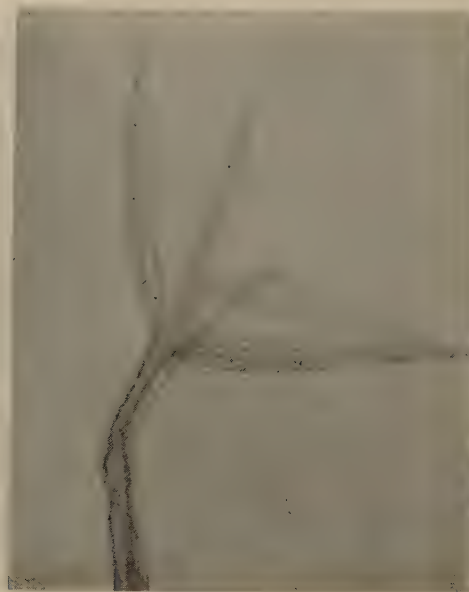


Fig. 9 - Fleur stérile (gross. X1)

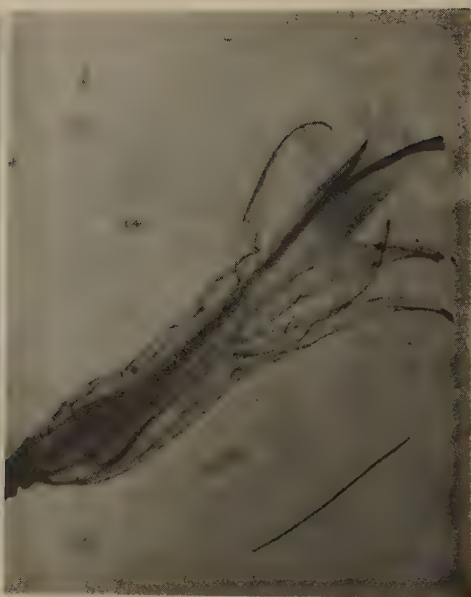


Fig. 10 - Fleur hermaphrodite
(gross. X0,8)

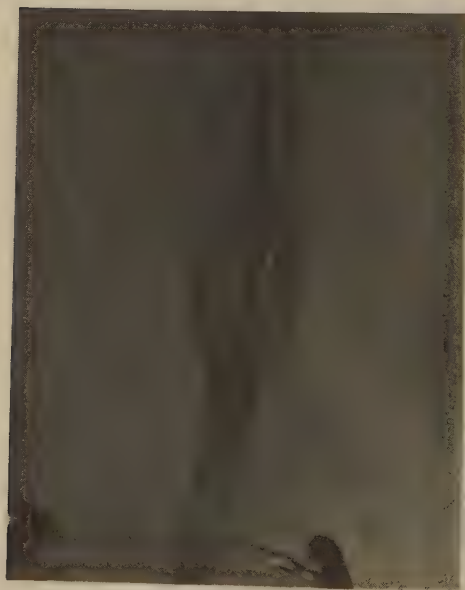


Fig. 11 - Fleur hermaphrodite
(les organes reproducteurs
gross. X1)

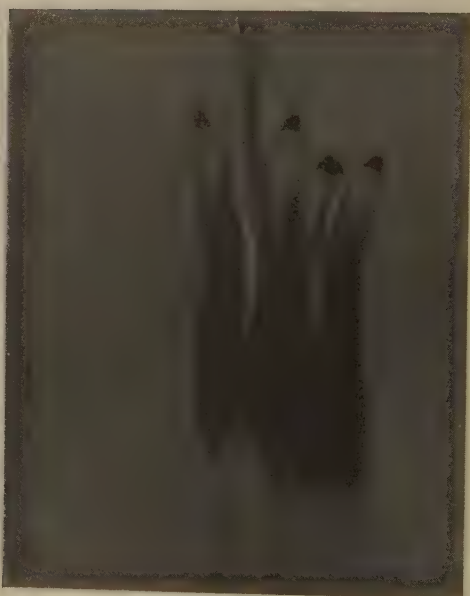


Fig. 12 - Les étamines (gross. x0,8)



La partie médiane des étamines
(gross. x 60)

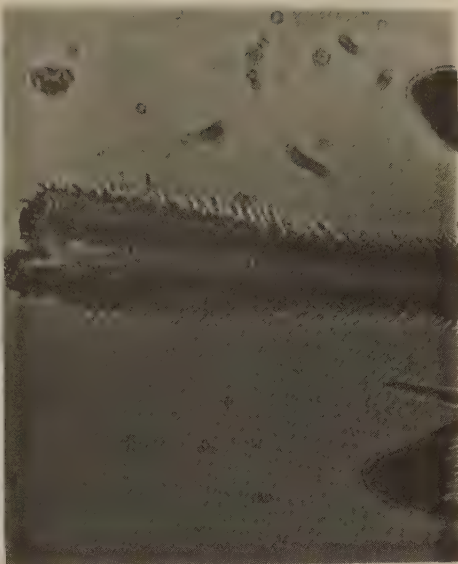


Fig. 13 - Stigmates (gross. X100)



Fig. 14 - Akène (gross. X20)



Fig. 14 - Partie apicale de l'akène
les pappus (gross. X200)

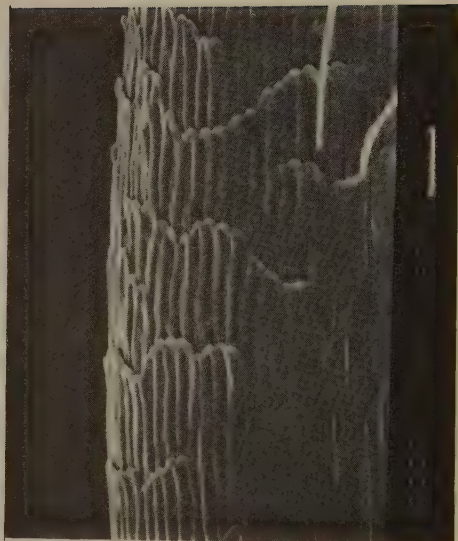
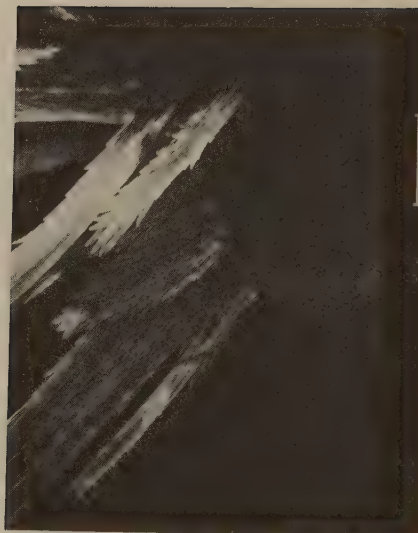


Fig. 14 - Surface écaillée de l'akène
(gross. X400)

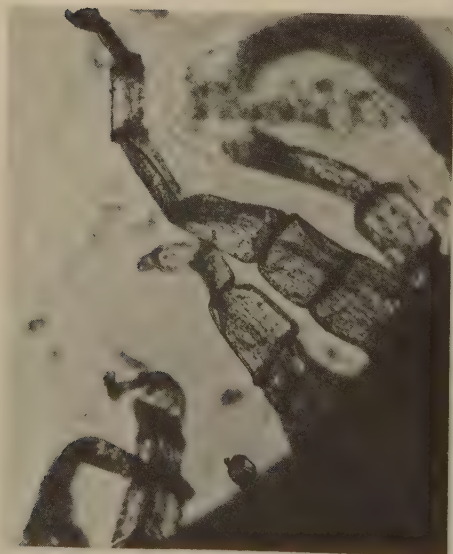
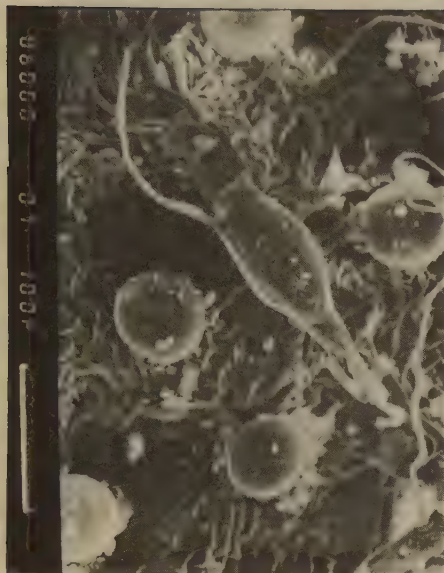


Fig. 15 - Poils sécréteurs de la tige
(gross. X 100)



Fig. 16 - Glandes sécrétrices de la feuille
avec pédoncule (gross. X 600)



Glandes sécrétrices de la feuille
en forme de bouteille (gross. X 300)

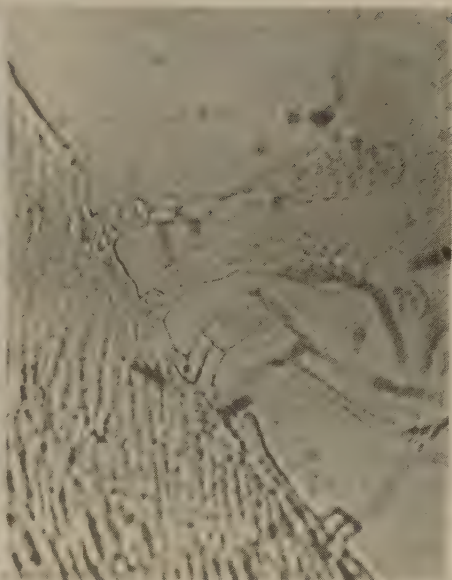


Fig. 17 - Glandes sécrétrices de l'involucre
(gross. X 100)



Fig. 18 - Les cristaux rhomboédriques
à la base des involucre
(gross. X100)

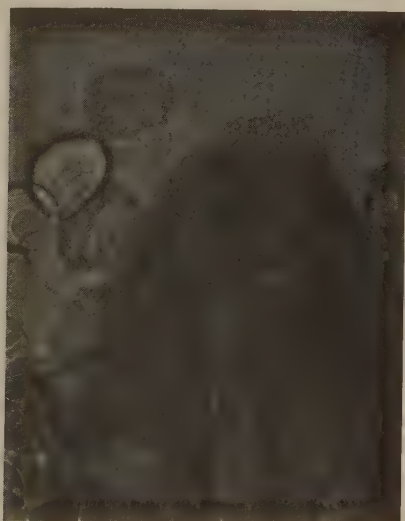


Fig. 19 - Bouton et ses glandes sécrétrices
(gross. X100)



Fig. 19 - Bouton et ses glandes sécrétrices
(gross. X200)



Fig. 19 - Bouton et ses glandes sécrétrices
(gross. X600)

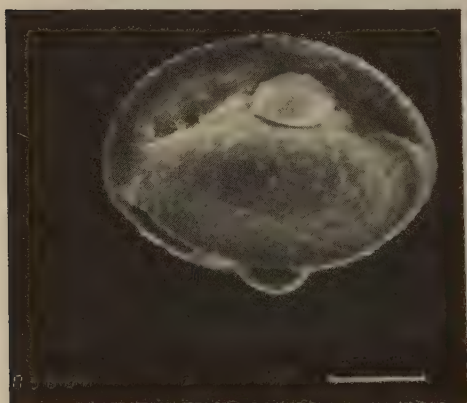


Fig. 20 - Les grains de pollen trycolporés
(gross. X2000)



Fig. 21 - Coupe transversale de la tige
(gross. X100)

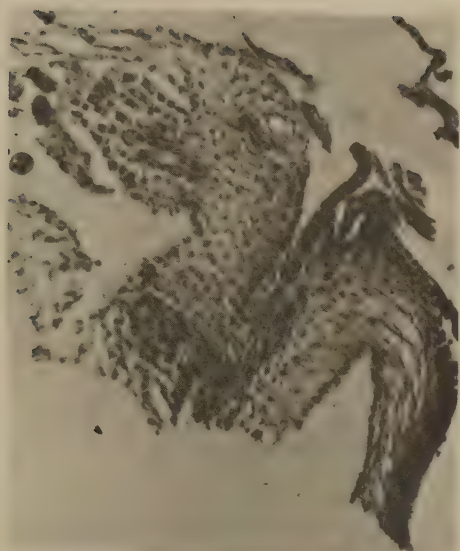


Fig. 22 - Coupe à travers d'anthère
(gross. X100)

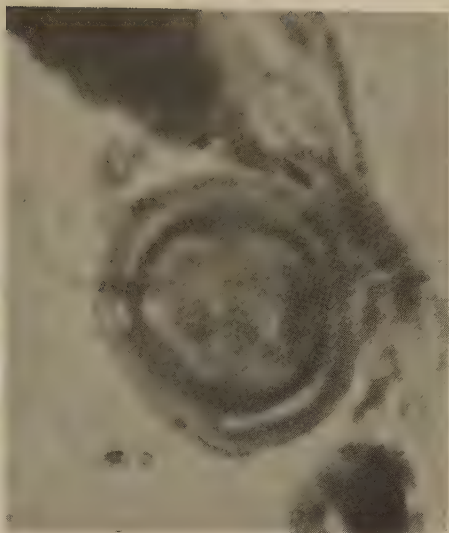


Fig. 23 - Grain de pollen - Coupe transversale
(gross. X400)

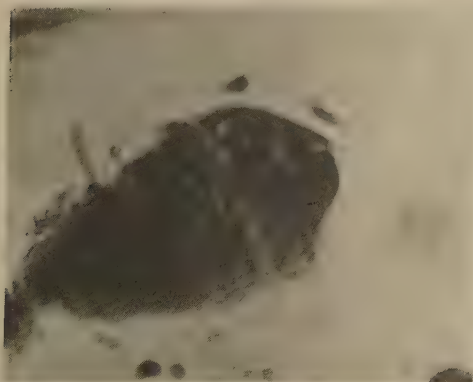


Fig. 24 - Coupe des glandes sécrétrices
(gross. X400)



Fig. 24 - Coupe des glandes sécrétrices
(gross. X400)

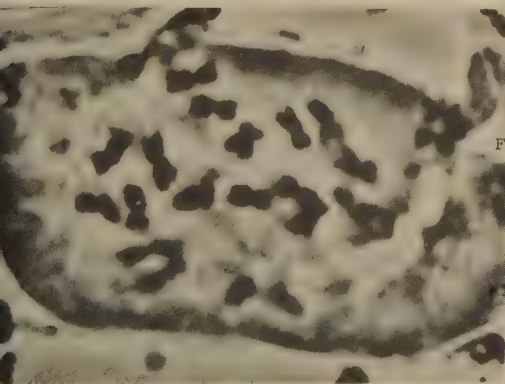


Fig. 25 - Métaphase $2n = 20$ chromosomes

P A R T I E II

Etude phytochimique

C H A P I T R E I

Introduction

Les Compositae se distinguent de la plupart des végétaux par leur pouvoir de synthétiser deux types d'acétogénines de caractère très particulier :

1. les dérivés aliphatiques polyinsaturés (polyènes, polyynes, composés mixtes), et
2. les lactones sesquiterpéniques non volatiles, dérivés du germacrane, du gaïane, du pseudogaïane, de l'élémane et de l'eudesmane.

La tribu des Senecioneae produit en outre des alcaloïdes dérivés de la pyrrolizidine à action hépatotoxique très prononcée, mais ces alcaloïdes ne peuvent être considérés comme une caractéristique des Compositae.

Les dérivés aliphatiques polyinsaturés semblent être produits par l'ensemble des Tubuliflorae. La tribu des Cardueae produit à la fois des polyènes et des polyynes, et des composés du deuxième type ont été isolés à partir de quelques espèces du genre Centaurea. Ces polyynes sont généralement confinés au niveau des racines, mais on en trouve également des traces infimes dans les canaux schizogènes des parties aériennes des plantes. Les fruits en sont totalement dépourvus.

Leur concentration extrêmement faible (0,01 à 0,0001%) dans les parties aériennes des Centaurea étudiées à ce jour, et la très grande labilité de leur molécule - notamment après dessiccation des tissus végétaux - rendent la recherche des polyynes singulièrement difficile, sinon aléatoire. C'est la rai-

son pour laquelle nous avons renoncé à les identifier dans la plante qui fait l'objet de ce travail.

Les lactones sesquiterpéniques isolées à partir de différents genres appartenant à la tribu des Cardueae, sont principalement des germacranolides, mais quelques gaïanolides et élémanolides ont été également mis en évidence. Quelle que soit leur appartenance chimique, les olides sesquiterpéniques comportant la séquence α -méthylène- γ -lactone, se distinguent par leurs propriétés bactériostatiques et cytostatiques, voire cytotoxiques. Quelques-uns de ces composés font actuellement l'objet de recherches très approfondies, en tant qu'agents potentiels à l'action antitumorale (Kupchan 1970, Rodriguez 1976, Smith 1972, Dupuis 1974-76).

D'après Kupchan (1970), les lactones sesquiterpéniques possédant des groupements α -méthylène sur l'anneau γ -lactone sont aptes à donner une réaction du type Michael avec les groupements -SH des acides aminés nécessaires à la synthèse des protéines bloquant ainsi cette synthèse.

Les propriétés biologiques des extraits de Centaurea belangeriana, dont nous faisons état dans la troisième partie de ce travail, nous ont incité à rechercher dans les différentes parties de la plante la présence de germacranolides, d'autant plus que la présence de cnicine a déjà été constatée chez C. calcitrapa, C. diffusa et C. maculosa.

A cet effet, nous avons effectué une extraction globale des parties aériennes de C. belangeriana selon la méthode générale décrite par Mabry. Le mode opératoire et les résultats de cette investigation sont consignés au chapitre suivant.

C H A P I T R E I I

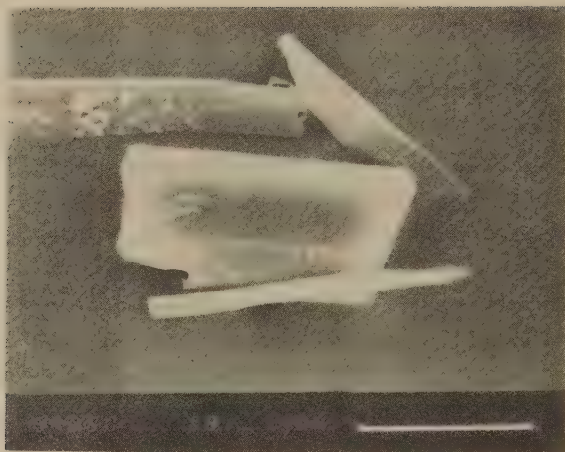
Isolement et identification de la cnicine

Méthode de Mabry (1969)

On fait macérer 1 kg de parties aériennes préalablement séchées et broyées de la plante, dans 5 l de chloroforme à la température ambiante, avec agitation continue. Après filtration, on évapore l'extrait chloroformique à sec et on reprend le résidu par 1,25 l d'éthanol à 95°. On ajoute à la solution éthanolique de l'acétate de plomb aqueux à 4% jusqu'à précipitation complète (500 ml), on filtre et on concentre le filtrat sous vide à un très petit volume. On extrait la phase hydro-éthanolique ainsi obtenue par 5 l de chloroforme et on évapore l'extrait chloroformique, à consistance sirupeuse (environ 40 g). On obtient à ce stade une masse visqueuse colorée en jaune-verdâtre. On chromatographie cette masse sur colonne de gel de silice 60 (Merck), en éluant successivement avec un mélange éther de pétrole-benzène, puis avec du benzène et finalement avec du chloroforme additionné de 5% de méthanol. L'éluat obtenu avec cette troisième phase mobile est évaporé à sec et le résidu cristallisé à partir d'un mélange chloroforme-méthanol 1 : 1

Nous avons isolé, au bout de ces opérations, 2 g de cristaux incolores, du système rhomboédrique (fig. 1).

La chromatographie de cette substance sur gel de silice G, révèle une tache unique.



Cristaux de cnicine

P.f. 143-144°. Spectre UV : maximum d'absorption à 218 nm.
Spectre IR : bandes d'absorption à 3400 cm^{-1} (groupement OH),
à 1760 cm^{-1} (-lactone), à 1700 cm^{-1} (ester non saturé), à
 1660 et 1630 cm^{-1} (doubles liaisons). Ces caractères physico-
chimiques correspondent à ceux de la cnicine, établis par
Suchy et coll. (1960).

Le spectre RMN, établi en 1979 par Rustayan, a apporté la
confirmation définitive que la substance isolée est la cnicine.
Nous reproduisons ci-après les données spectrales fournies par
l'auteur précité, qui sont en accord avec celles publiées par
Samek et coll. (1969).

Rappelons ici que la cnicine a été isolée pour la première
fois à partir de Cnicus benedictus L. et que sa structure a
été précisée par Samek et coll. (1969).

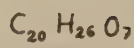
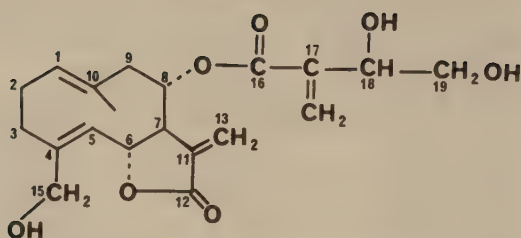
Complément technique selon Rustayan et coll. (1979)

^1H - NMR - data of Cnicin (I) 270 MHz, TMS as internal standard

	DMSO d6	DMSO + D ₂ O	CDC13 + DMSO 4 : 1
H - 1	5.0-5.10 m	4.95-5.05 m	4.95-5.10 m
H - 5	4.85 d(9.5)	4.85 d(9.5)	4.83 d(9.5)
H - 6	5.22 dd(9.5;8.5)	5.17 dd(9.5;8.5)	5.24 dd(9.5;8.5)
H - 8	5.0-5.10 m	4.95-5.05 m	4.95-5.10 m
H - 13	5.72 d(3.0)	5.72 d(3)	5.76 d(3.0)
H - 13	6.07 d(3.0)	6.07 d(3)	6.18 d(3.0)
H - 14	1.43 s(br)	1.41 s(br)	1.54 s(br)
H - 15	3.87 dd(13.5;5.5)	4.10 d(13.5)	4.04 dd(13.5;5.5)
H - 15	4.08 dd(13.5;4.5)		4.20 dd(13.5;4.0)
H - 18	4.35 m	4.33 m	4.50 m
H - 19	--	3.49 dd(12;4.0)	3.70 ddd(11.5;6.5;4.0)
H - 19	--	3.31 dd(12;6.5)	3.42 ddd(11.5;7.0;6.5)
 C17 = H	6.22 s(br)	6.24 s(br)	6.32 s(br)
 C17 = H	5.97 s(br)	5.96 s(br)	6.09 s(br)

Chemical shift values are reported in ppm, δ scale.

Figures in parentheses are coupling constants in Hz.



CNICINE

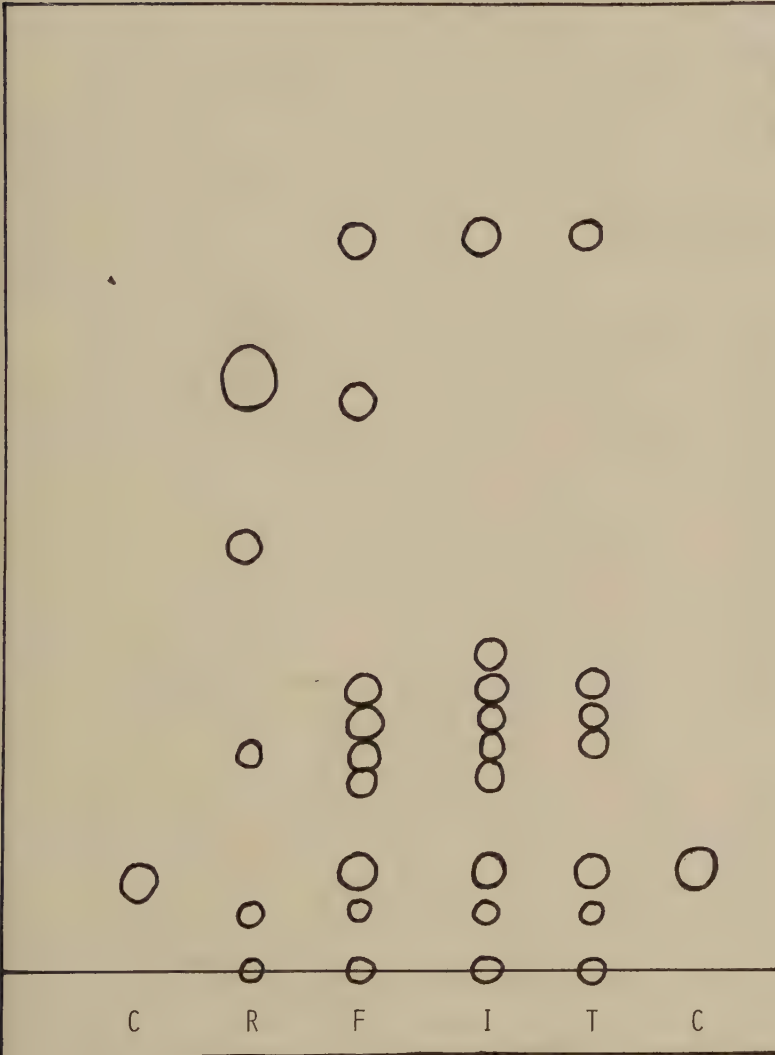
Lactone sesquiterpénique du type germacranolide

A la suite de cette constatation, nous avons procédé à une estimation semi-quantitative de la concentration de la cnicine dans les différentes parties de la plante.

Nous avons extrait dans ce but 5 g de racines, de tiges, de feuilles et de capitules séchés et broyés, selon la méthode décrite plus haut. Après évaporation à sec des extraits, nous avons dissous les résidus dans 1 ml de méthanol et porté 50 μ l de chacune des solutions méthanoliques sur une chromatoplaque de gel de silice G. Nous avons également déposé sur la chromatoplaque 2 fois 50 μ l de solution de cnicine pure à 0,2% dans le méthanol. Après développement avec une phase mobile composée de 9 vol. de chloroforme et 1 vol. de méthanol, nous avons révélé le chromatogramme avec du sulfate de cérium IV. La cnicine présente dans ces conditions une fluorescence orangée à 365 nm (fig. 2).

Figure 2

Chromatogramme d'extraits de différentes parties
de Centaurea belangeriana DC



C = cnicine

R = racine

F = feuille

I = inflorescence

T = tige

Ce chromatogramme nous montre que la cnicine est absente dans la racine et qu'elle se trouve accumulée principalement au niveau des feuilles. Sa concentration va en décroissant dans les capitules et les tiges.

C H A P I T R E I I I

Conclusions

La présence de la cnicine dans les parties aériennes de Centaurea belangeriana DC, nous permet d'expliquer à la fois la saveur très amère de la plante et les propriétés antibiotiques des extraits, consignés dans la troisième partie du présent travail.

De plus, la mise en évidence de la production de cnicine par C. belangeriana, confirme la caractéristique chimiotaxonomique propre à la tribu des Cardueae, à savoir la biosynthèse de germacranolides non volatiles. Rappelons à ce propos que des composés appartenant à cette classe ont été détectés chez les genres Arctium, Cnicus, Centaurea et Cynara.

Du fait que la concentration de la cnicine atteint un maximum au niveau des feuilles, il nous est permis de supposer qu'il existe une corrélation entre la fréquence d'organes sécréteurs sur une partie donnée de la plante et la teneur de cette partie en principe actif.

PARTIE III

MICROBIOLOGIE

Effets antibiotiques de la cnicine sur les micro-
organismes de nature végétale et animale

Introduction

Nos expériences microbiologiques ont débuté avant la détermination de la nature chimique du principe actif. Ce n'est donc qu'après l'obtention de nos résultats microbiologiques que nous avons su que notre produit cristallisé expérimenté était la Cnicine. Celle-ci extraite de Cnicus benedictus L. (Vanhaelen-Fastré 1976) a présenté une action antibactérienne. La nôtre extraite d'un autre Compositae, Centaurea belangeriana (DC) Bornm. a été expérimentée non seulement sur des bactéries où nous avons retrouvé son action inhibitrice, mais aussi chez des champignons pathogènes et des protozoaires.

Aucune recherche précédente n'a été effectuée avec des extraits de Centaurea belangeriana DC. C'est donc pour la première fois que des résultats sont présentés sur l'activité de ce Composé sur quelques micro-organismes de nature végétale et animale.

C H A P I T R E I

ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

- Matériels et méthodes
- Résultats
- Discussion

Bactéries expérimentées

L'activité in vitro des produits bruts et purifiés provenant de l'extrait de Centaurea belangeriana (DC) a été expérimentée sur quelques espèces de bactéries Gram positives et Gram négatives dont la liste pour l'essai de chacun des produits est la suivante :

I - PRODUIT BRUT

a) Bactéries Gram positives

- Bacillus anthracis
- Corynebacterium diptheriae
- Diplococcus pneumoniae
- Staphylococcus aureus
- Streptococcus β hémolyticus

b) Bactéries Gram négatives

- Escherichia coli
- Klebsiella pneumoniae
- Neisseria Sp
- Salmonella paratyphi B
- Proteus mirabilis
- Pseudomonas aeruginosa

II - PRODUIT PURIFIÉ

a) Bactéries Gram positives

- Bacillus anthracis
- Bacillus subtilis
- Corynebacterium diptheriae
- Diplococcus pneumoniae
- Streptococcus β hémolyticus

b) Bactéries Gram négatives

- Escherichia coli
- Klebsiella pneumoniae
- Salmonella paratyphi B
- Shigella flexneri
- Proteus mirabilis
- Pseudomonas aeruginosa

MATERIELS ET METHODESa) Préparation de la solution mère

100 mg de la poudre desséchée du produit brut et 100 mg du produit purifié après avoir été séparément dissous dans 1 ml d'acétone, ont été utilisés pour la préparation d'une solution mère à la concentration de 10 mg/ml dans un sérum physiologique stérile.

b) Préparation des dilutions et mesure des activités

Les dilutions de 5; 2,5 et 1,25mg/ml ont été préparées à partir de la solution mère. Les solutions diluées ainsi que la solution mère ont été conservées dans des conditions de stérilité au réfrigérateur à 4° C.

Pour l'étude de l'activité in vitro des produits, nous avons appliqué la méthode des disques qui peut être comparée avec celle de l'antibiogramme.

c) Préparation des boîtes de Pétri

1 ml d'une culture âgée de 6 heures d'une bactérie donnée dans un bouillon nutritif a été coulé dans le fond d'une boîte de Pétri stérile de 11 cm de diamètre. Ensuite, 14 ml d'une gélose nutritive liquéfiée et refroidie à 45° C ont été ajoutées à la culture existante dans la boîte. Après avoir soigneusement mélangé la culture avec la gélose, la boîte a été abandonnée jusqu'à solidification de la gélose.

d) Préparation des disques

Des disques de 6 mm de diamètre et de 1 mm d'épaisseur ont été imprégnés de 0,05 ml de chacune des dilutions provenant soit du produit brut soit du produit purifié. L'imprégnation s'est faite en plaçant les disques dans une boîte de Pétri ; ils ont ensuite été transférés dans l'étuve à 37° C pour un séjour de 24 heures. Enfin, les disques ont été placés dans des flacons bouchés et stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 120° C. Les produits se sont montrés thermostables.

e) Préparation des boîtes de Pétri renfermant les disques

Après la solidification des milieux de culture, les disques préalablement préparés ont été déposés au nombre de 7 à la surface de la gélose en respectant l'espace nécessaire pour la séparation des zones d'inhibition éventuellement formées à leur périphérie.

f) Incubation

L'incubation des boîtes a été faite dans l'étuve à 37° C. Ainsi, les exigences spécifiques du développement des bactéries expérimentées ont été assurées pendant la période de l'incubation.

g) Lecture des résultats

Elle a été faite deux fois à 12 heures d'intervalle. Une première lecture a été faite 24 heures après l'incubation et une deuxième lecture, 36 heures après l'incubation. Nous avons apprécié l'efficacité des produits par la mesure du diamètre des zones d'inhibition formées à la périphérie des disques (planches I et II). Les chiffres figurés sur les tableaux ne sont que des moyennes obtenues à la suite des trois lectures.

h) Résultats

Nous avons groupé séparément les résultats obtenus des expérimentations par les produits bruts et purifiés dans les tableaux qui suivent. Les concentrations y sont exprimées en microgrammes et les diamètres en millimètres.

Tableau I - Inhibitions obtenues avec le produit brut

Bactéries (Gram +)	Concentration (µg/ml)	Diamètre moyen* d'inhibition (mm)
<u>Bacillus anthracis</u>	500	26
" "	250	20
" "	125	15
" "	62,5	12
<u>Corynebacterium diphteriae</u>	500	12
" "	250	10
" "	125	0
" "	62,5	0
<u>Diplococcus pneumoniae</u>	500	27
" "	250	22
" "	125	15
" "	62,5	9
<u>Staphylococcus aureus</u>	500	18
" "	250	15,5
" "	125	12
" "	62,5	8
<u>Streptococcus hémolysicus</u>	500	22
" "	250	18
" "	125	14
" "	62,5	12

* moyenne sur 3 expériences $\pm$ 0,5 mm

Tableau II - Inhibitions obtenues avec le produit brut

Bactéries (Gram -)	Concentration (µg/ml)	Diamètre moyen* d'inhibition (mm)
<u>Escherichia coli</u>	500	13
" "	250	9
" "	125	0
" "	62,5	0
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	500	15
" "	250	13
" "	125	7
" "	62,5	0
<u>Neisseria sp.</u>	500	13
" "	250	11
" "	125	7
" "	62,5	0
<u>Salmonella paratyphi B</u>	500	13
" "	250	10
" "	125	0
" "	62,5	0
<u>Proteus mirabilis</u>	500	19
" "	250	12
" "	125	8
" "	62,5	0
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	500	0
" "	250	0
" "	125	0
" "	62,5	0

* moyenne sur 3 expériences $\pm$ 0,5 mm

Tableau III - Inhibitions obtenues avec le produit pur

Bactéries (Gram +)	Concentration (µg/ml)	Diamètre moyen* d'inhibition (mm)
<u>Bacillus anthracis</u>	500	20
" "	250	17
" "	125	15
" "	62,5	9
<u>Bacillus subtilis</u>	500	16
" "	250	12
" "	125	7
" "	62,5	0
<u>Corynebacterium diphteriae</u>	500	10
" "	250	0
" "	125	0
" "	62,5	0
<u>Diplococcus pneumoniae</u>	500	17
" "	250	12
" "	125	0
" "	62,5	0
<u>Streptococcus hémolyticus</u>	500	15
" "	250	12
" "	125	0
" "	62,5	0

* moyenne sur 3 expériences $\pm$ 0,5 mm

Tableau IV - Inhibitions obtenues avec le produit pur

Bactéries (Gram -)	Concentration (µg/ml)	Diamètre moyen* d'inhibition (mm)
<u>Escherichia coli</u>	500	20
" "	250	15
" "	125	12
" "	62,5	0
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	500	9
" "	250	0
" "	125	0
" "	62,5	0
<u>Salmonella paratyphi B</u>	500	15
" "	250	12
" "	125	9
" "	62,5	0
<u>Shigella flexneri</u>	500	**
" "	250	15
" "	125	11
" "	62,5	9
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	500	0
" "	250	0
" "	125	0
" "	62,5	0
<u>Proteus mirabilis</u>	500	22
" "	250	17
" "	125	10
" "	62,5	0

* moyenne sur 3 expériences $\pm$ 0,5 mm

** cette expérience n'a pas été réalisée

Méthode de dilution

Cette méthode a été appliquée aux germes les plus sensibles déjà identifiés par la méthode de diffusion.

Germes utilisés :

- *Bacillus anthracis*
- *Proteus mirabilis*
- *Salmonella para B*
- *Shigella sp.*

Méthode : à l'aide d'un spectrophotomètre et par l'étude du degré turbidimétrique des dilutions différentes de bactéries qui ont été préalablement mises en contact avec les différentes dilutions des produits, les pouvoirs inhibiteurs de l'extrait brut et du cristal ont été testés.

On a ainsi pu déterminer la concentration minimum des produits inhibiteurs (CMI) définie comme la concentration tuant des germes déterminés dans une période de temps fixée à 24 heures.

<u>Résultats</u>	<u>CMI</u>
<i>Bacillus anthracis</i>	+ 350 µg/ml
<i>Proteus mirabilis</i>	250 µg/ml
<i>Salmonella para B</i>	500 µg/ml
<i>Shigella sp.</i>	- 250 µg/ml

La méthode de subculture a été utilisée pour déterminer l'existence éventuelle de germes résistants déjà soumis à l'action des produits, en utilisant les milieux solides dans les pétris.

Pour la vérification des changements éventuels produits par contact avec l'antibiotique, nous avons transporté les colonies résistantes dans les milieux sélectifs propres à chaque germe.

Le seul germe qui a subi un changement d'assimilation et de métabolisme, c'est *Proteus mirabilis*, qui ensuite, après une semaine de retard, a repris son développement normal.

Discussion

A) Activités du produit brut sur les bactéries Gram-positives

La plus grande sensibilité a été obtenue à la concentration de 62,5 µg/ml pour Bacillus anthracis et Streptococcus β hémolyticus qui ont produit une zone d'inhibition de 12 mm de diamètre. Le diamètre maximal d'inhibition de 27 mm a été noté pour Diplococcus pneumoniae à la concentration de 500 µg/ml, tandis que Staphylococcus aureus exposé à la concentration de 62,5 µg/ml a fourni le minimum d'inhibition (8 mm). Corynebacterium diphtheriae est la bactérie la moins sensible ; elle ne présente aucune zone d'inhibition en présence de la concentration 125 et 62,5 µg/ml du produit brut.

B) Activité du produit brut sur les bactéries Gram-négatives

Proteus mirabilis s'est montrée la bactérie la plus sensible en produisant une zone d'inhibition de 8 mm de diamètre en présence d'une concentration de 125 µg/ml. Le produit brut à la concentration de 500 µg/ml fournit la zone maximale d'inhibition à Proteus mirabilis avec un diamètre de 19 mm, tandis que le diamètre minimal d'inhibition est obtenu à la concentration de 125 µg/ml pour Klebsiella pneumoniae et Neisseria sp. qui est de 7 mm. Pseudomonas aeruginosa est la bactérie la moins sensible car elle ne montre aucune sensibilité aux concentrations du produit expérimenté.

C) Activité du produit purifié sur les bactéries Gram-positives

La plus grande sensibilité vis-à-vis de la concentration 62,5 µg/ml du produit purifié a été obtenue pour Bacillus anthracis dont le diamètre d'inhibition est de 9 mm. A la concentration de 500 µg/ml, la même bactérie a fourni une zone maximale d'inhibition de 20 mm de diamètre. La zone minimale d'inhibition a été notée pour Bacillus subtilis à la concentration de 125 µg/ml du produit purifié. Le diamètre de cette inhibition a été de 7 mm. Corynebacterium diphtheriae s'est montrée comme la bactérie la moins sensible car elle n'a répondu qu'à la dilution de 500 µg/ml, avec un diamètre moyen d'inhibition de 10 mm.

D) Activité du produit purifié sur les bactéries Gram-négatives

Shigella flexneri avec un diamètre d'inhibition de 9mm à la concentration de 62,5 µg/ml s'est révélée comme la bactérie la plus sensible. Une zone maximale d'inhibition au diamètre de 22 mm a été notée pour Proteus mirabilis à la concentration de 500 µg/ml du produit. La concentration 125 µg/ml a fourni une inhibition minimale avec 9 mm de diamètre pour Salmonella paratyphi B. Pseudomonas aeruginosa s'est montrée comme la bactérie la moins sensible, car elle n'a pas répondu aux concentrations expérimentées.

E) Fréquence des cas de réponse positives selon les dilutions étudiées

Nous allons étudier cette fréquence sur les tableaux suivants :

Tableau I - Nombre de réponses positives selon les dilutions

Bactéries	Produit brut (µg/ml)				Produit pur (µg/ml)			
	500	250	125	62,5	500	250	125	62,5
Gram +	5	5	4	4	5	4	2	1
Gram -	5	5	3	0	5	4	4	1

Tableau II - Comparaison des réponses positives avec le produit brut

Dilutions (ug/ml)	Nombre de réponses positives	
	Gram +	Gram -
500	5	5
250	5	4
125	4	2
62,5	4	1

Tableau III - Comparaison des réponses positives avec le produit pur

Dilutions (ug/ml)	Nombre de réponses positives	
	Gram +	Gram -
500	5	5
250	5	4
125	3	4
62,5	0	1

De tous les résultats présentés ci-dessus nous pouvons conclure que :

- 1) Le produit brut est actif sur un nombre plus important de bactéries Gram positives que de bactéries Gram négatives (18 cas contre 12 cas).
- 2) Le nombre de réponses positives avec le produit pur pour les bactéries Gram négatives est supérieur à celui des Gram positives (14 cas contre 13 cas).
- 3) Les bactéries Gram négatives sont plus sensibles à l'action du produit pur que les bactéries Gram positives, tandis que les bactéries Gram positives se sont montrées plus sensibles à l'action du produit brut en comparaison avec les bactéries Gram négatives.
- 4) Parmi les bactéries Gram négatives, Pseudomonas aeruginosa ne montre aucune sensibilité aux dilutions étudiées des deux produits, tandis que Corynebacterium diptheriae est la bactérie la moins sensible à l'action des deux produits.
- 5) Parmi les Gram positives, Bacillus anthracis est la bactérie la plus sensible vis-à-vis de l'action des deux produits.
- 6) Parmi les Gram négatives, Proteus mirabilis a été la bactérie la plus sensible à l'action du produit brut, Escherichia coli s'est montrée la bactérie la plus sensible à l'activité du produit pur.

Shigella flexneri est plus sensible que Escherichia coli, mais l'expérimentation avec le produit brut, pour cette bactérie, n'a pas été satisfaisante. Salmonella paratyphi B est aussi un germe assez sensible.

P L A N C H E I ---

Fig. 1 - Activité de la substance purifiée sur Staphylococcus aureus

a =	Concentration	175	µg/ml
b =	"	200	µg/ml
c =	"	225	µg/ml
d =	"	250	µg/ml
e =	"	275	µg/ml
f =	"	300	µg/ml
g =	"	325	µg/ml
h =	"	375	µg/ml
i =	"	500	µg/ml

Fig. 2 - Activité de la substance brute sur Bacillus anthracis

a =	Concentration	175	µg/ml
b =	"	225	µg/ml
c =	"	275	µg/ml
d =	"	325	µg/ml
e =	"	375	µg/ml
f =	"	500	µg/ml

Fig. 3 - Thermostabilité de la Chicine (après autoclavage) sur Staphylococcus aureus

a =	Concentration	500	µg/ml
b =	"	250	µg/ml

Fig. 4 - Activité de la substance brute sur Klebsiella pneumoniae

a =	Concentration	175	µg/ml
b =	"	225	µg/ml
c =	"	275	µg/ml
d =	"	325	µg/ml
e =	"	375	µg/ml
f =	"	500	µg/ml

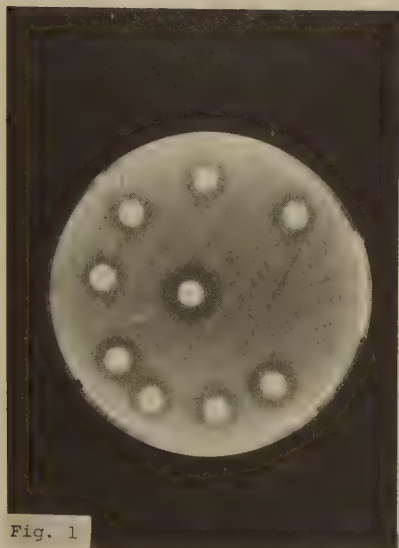


Fig. 1

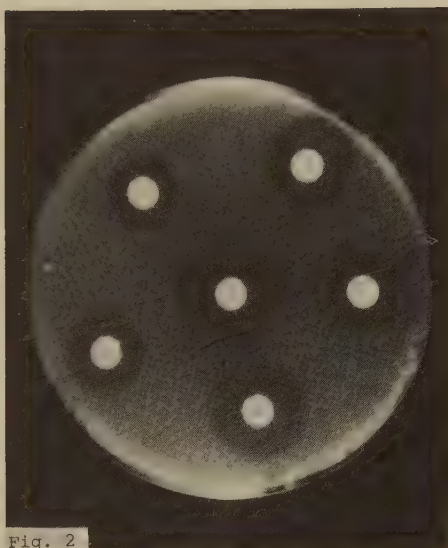


Fig. 2

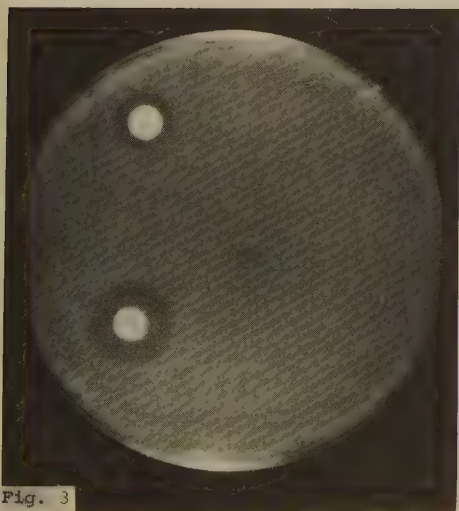


Fig. 3

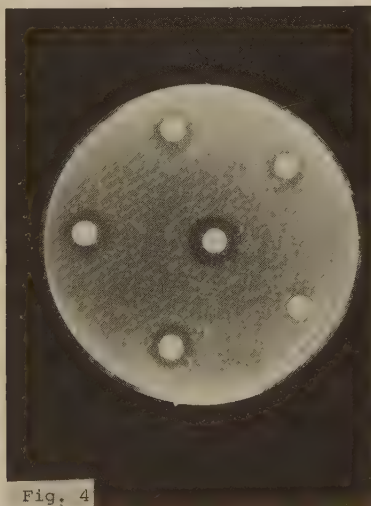


Fig. 4

P L A N C H E II

Fig. 5 - Activité de la substance purifiée sur Shigella flexneri

a =	Concentration	62,5 $\mu\text{g/ml}$
b =	"	125 $\mu\text{g/ml}$
c =	"	250 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 6 - Activité de la substance purifiée sur Proteus mirabilis

a =	Concentration	62,5 $\mu\text{g/ml}$
b =	"	125 $\mu\text{g/ml}$
c =	"	250 $\mu\text{g/ml}$
d =	"	500 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 7 - Activité de la substance purifiée sur Escherichia coli

a =	Concentration	62,5 $\mu\text{g/ml}$
b =	"	125 $\mu\text{g/ml}$
c =	"	250 $\mu\text{g/ml}$
d =	"	500 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 8 - Activité de la substance purifiée sur Pseudomonas aeruginosa

a =	Concentration	62,5 $\mu\text{g/ml}$
b =	"	125 $\mu\text{g/ml}$
c =	"	250 $\mu\text{g/ml}$
d =	"	500 $\mu\text{g/ml}$

P L A N C H E II ---

Fig. 9 - Activité de la substance purifiée sur Salmonella para. B

a	=	Concentration	62,5 µg/ml
b	=	"	125 µg/ml
c	=	"	250 µg/ml
d	=	"	500 µg/ml

Fig. 10 - Activité de la substance purifiée sur Bacillus anthracis

a	=	Concentration	62,5 µg/ml
b	=	"	125 µg/ml
c	=	"	250 µg/ml
d	=	"	500 µg/ml

Fig. 11 - Activité de la substance purifiée sur Bacillus subtilis

a	=	Concentration	62,5 µg/ml
b	=	"	125 µg/ml
c	=	"	250 µg/ml
d	=	"	500 µg/ml



Fig. 5



Fig. 6

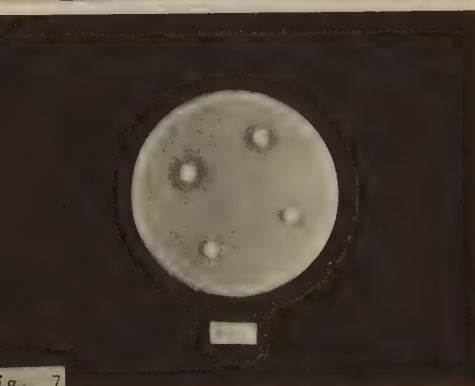


Fig. 7

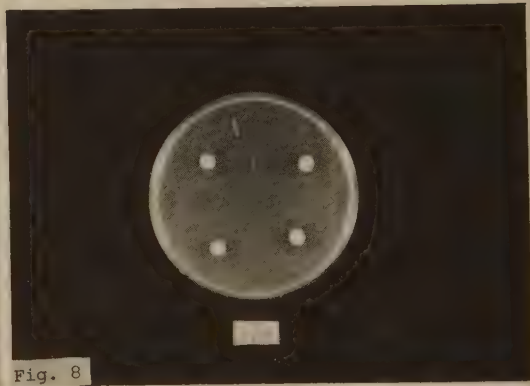


Fig. 8

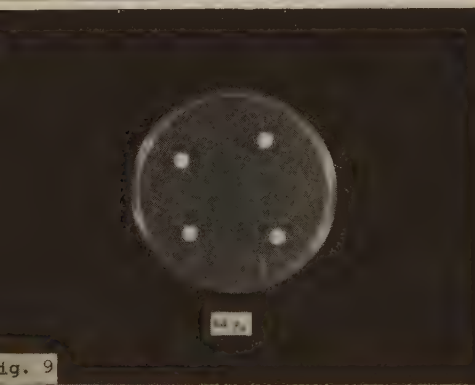


Fig. 9



Fig. 10

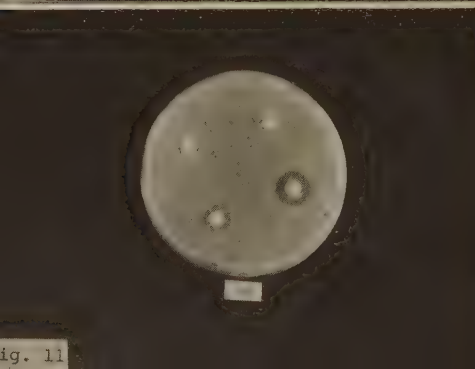


Fig. 11

CHAPITRE II

ACTIVITES ANTIFONGIQUES

- Matériels et méthodes
- Résultats
- Discussion

Matériels et méthodes

L'activité in vitro des produits bruts et purifiés a été étudiée sur quelques espèces de champignons filamenteux et levuriformes. Outre l'activité in vitro, l'activité in vivo de ces deux produits a été également expérimentée sur une espèce de levure. Voici la liste des champignons étudiés :

A) Champignons levuriformes

- Candida albicans
- Cryptococcus neoformans
- Rhodotorula sp.
- Torulopsis glabrata

B) Champignons filamenteux

1- Dermatophytes

- Epidermophyton floccosum
- Keratinomyces ajelloi
- Microsporum canis
- Microsporum gypseum
- Trichophyton mentagrophytes
- Trichophyton rubrum

2- Moisissures saprophytes

- Alternaria sp.
- Aspergillus flavus
- Aspergillus fumigatus
- Aspergillus niger
- Cephalosporium sp.
- Mucor sp.
- Rhizopus sp
- Scopulariopsis brevicaulis

A) Etude de l'activité sur les champignons levuriformes

I) Activité in vitro

Deux produits ont été testés sur le développement général de toutes les levures étudiées. Pour le Candida albicans, l'étude a été effectuée d'une façon plus détaillée en réalisant les tests plus spécifiques de la chlamydosporulation, filamentation en sérum, auxanogramme, zymogramme et photosensibilisation.

a) Préparation des dilutions

A partir de la solution mère (100 mg/ml) des deux produits, les dilutions de 10;5;2,5;1,25 et 0,5 mg/ml ont été préparées dans un sérum physiologique stérile.

b) Test de l'activité sur le développement général des levures

La méthode utilisée dans l'étude de l'activité sur les bactéries a été appliquée avec quelques modifications d'ordre technique. Sur des milieux solides de Sabouraud coulés dans des boîtes de Pétri de 11 cm de diamètre, on a pratiqué séparément l'ensemencement par écouvillon des levures à étudier. Cet ensemencement a couvert d'une façon uniforme toute la surface de la gélose. Ensuite, des disques de papier de 6 mm de diamètre imprégnés de différentes solutions des produits bruts et purifiés ont été déposés à la surface des géloses à des distances appropriées. L'incubation des boîtes a été faite dans l'étuve à 25° C et la lecture des résultats a été pratiquée dans les 48 heures suivant l'incubation. L'inoculum témoin n'a reçu aucun traitement.

c) Production des chlamydospores

Le culot provenant de trois lavages successifs d'une suspension de Candida albicans ayant préalablement été en contact pendant 8, 24 et 48 heures avec les différentes dilutions des deux produits a été cultivée sur le milieu de Nickerson et Mankowski à 25° C. Un tube témoin accompagnait les séries.

d) Filamentation dans le sérum

Quelques gouttes d'une suspension de Candida provenant du troisième lavage des levures traitées pendant 8, 24 et 48 heures par les deux produits à des concentrations différentes, ont été ajoutées à 0,5 ml du sérum de lapin. La lecture des résultats s'est effectuée dans les quatre heures suivant l'incubation à 37° C. Un tube témoin a été ajouté.

e) Auxanogramme

1 ml d'une suspension du culot de centrifugation provenant de trois lavages successifs d'une culture de Candida ayant été en contact préalable pendant 8, 24 et 48 heures avec différentes dilutions des deux produits a été versé dans le fond d'une boîte de Pétri. Ensuite, 14 ml du milieu de Carbon Base (Difco) liquéfié et refroidi à 45° C ont été coulés dans la boîte. Après la solidification de la gélose, des disques des différents sucres (glucose, maltose, lactose, saccharose, galactose, raffinose) ont été déposés à la surface de la gélose. L'incubation des boîtes a été faite à l'étuve à 25° C. Une boîte témoin a été préparée sans aucun traitement préalable effectué sur des Candida.

f) Zymogramme

Dans des tubes d'hémolyse stériles et après avoir déposé un disque de sucre dans chaque tube, on a ajouté 1 ml d'une suspension de levures préalablement traitées et lavées. Ensuite, 2 ml du milieu de Nitrogen Base (Difco) liquéfié et refroidi à 45° C ont été versés dans les tubes. Les tubes ainsi préparés, avec un tube témoin ont été incubés dans l'étuve à 25° C pour une durée de 48 heures.

g) Photosensibilisation

Afin de vérifier le pouvoir photosensibilisant éventuel des produits expérimentés, un test de photosensibilisation a été pratiqué in vitro sur le Candida albicans. Des disques

imprégnés de différentes solutions des deux produits ont été déposés à la surface d'une culture en nappe de Candida sur la gélose de Sabouraud sans antibiotique. Ensuite, l'ensemble des disques et la culture ont été soumis à l'irradiation par les rayons Ultra-violet. Les boîtes irradiées et une boîte témoin ont été incubées dans l'étuve à 25° C pour 10 jours.

II Activités in vivo

1 ml d'une suspension de Candida renfermant 4×10^6 levures/ml après avoir été mis en contact pendant 8, 24 et 48 heures avec différentes dilutions des produits a été injecté par la voie intraveineuse à des lapins. Au cours de chaque expérimentation, un lapin a été injecté d'un ml d'une suspension de Candida qui n'avait pas subi l'action des deux produits.

B) Etude de l'activité sur les champignons filamenteux

Un carré de 0,5 x 0,5 cm d'une culture de champignons filamenteux après avoir été pendant 8, 24 et 48 heures en contact avec des différentes dilutions des produits étudiés, a été repiqué sur le milieu solide sans antibiotique de Sabouraud. Un tube témoin a également été ensemencé. La lecture des résultats a été faite dans les dix jours suivant l'incubation dans l'étuve à 25° C.

Résultats

A) Champignons levuriformes

a- Activité sur le développement normal

Les différentes concentrations des deux produits n'ont exercé aucune activité inhibitrice sur le développement normal in vitro des levures étudiées.

b- Production des chlamydo-spores

La production des chlamydo-spores a été inhibée par la concentration 2,5 mg/ml des deux produits après 8 heures de contact.

c- Auxanogramme et zymogramme

Aucune des concentrations des deux produits n'a pu exercé une influence significative sur le pouvoir fermentatif et assimilateur des sucres étudiés (glucose, maltose, lactose, saccharose, galactose, raffinose).

d- Filamentisation dans le sérum

Dans le sérum les Candida filamentent plus ou moins sous l'action des deux produits, mais les filamentations sont dégénérées par rapport à la normale (fig. 12).

e- Photosensibilisation

Les produits ne possèdent aucun pouvoir photosensibilisant sur le Candida albicans exposé à l'irradiation par les Ultra-violets.

f- Activité in vivo

Seul l'inoculum ayant été en contact pendant 48 heures avec la concentration la plus forte (10 mg/ml) des produits s'est montré capable d'inhiber le pouvoir pathogène de Candida albicans pour les lapins. Ces derniers sont restés vivants. L'inoculum provenant d'un contact moins long (24 heures) avec les produits n'a pu que retarder la mort des animaux inoculés. Les témoins sont morts trois jours après l'inoculation. Des dilutions moins fortes n'ont par contre pu retarder le pouvoir pathogène.

B) Champignons filamenteux

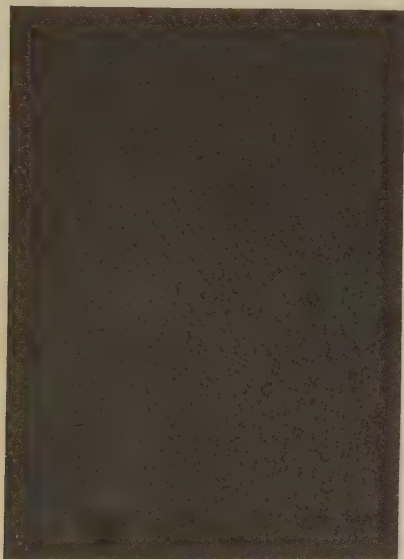
a- Moisissures saprophytes

Aucune dilution des deux produits n'a pu exercer un pouvoir inhibiteur sur le développement normal des moisissures expérimentées.

b- Dermatophytes

Les résultats des activités des produits sur les Dermatophytes sont réunis sur les tableaux qui suivent.

Fig. 12 - Filamentation de *Candida albicans* dans le sérum



a) témoin



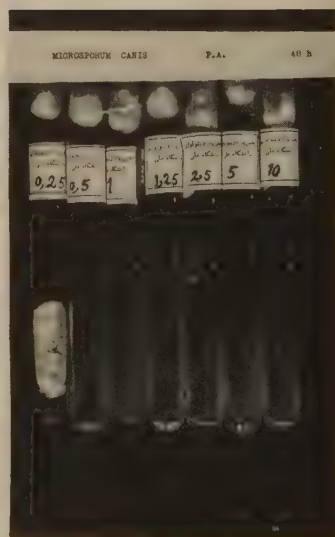
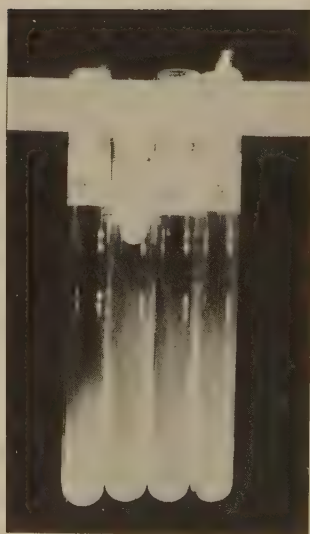
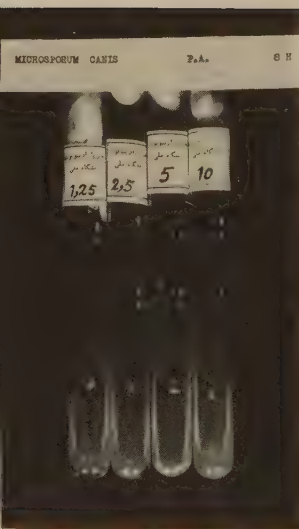
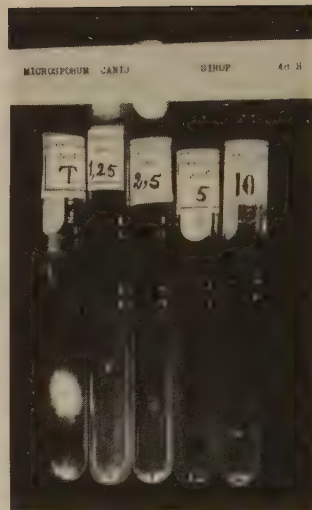
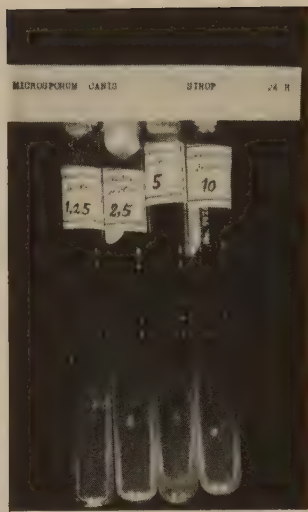
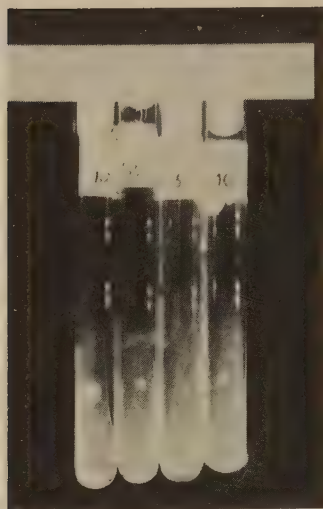
b) après contact avec la cnicine

I - Inhibitions de croissance obtenues avec le produit brut

Dermatophytes	Temps de contact (heures)	Concentration (mg/ml)	Croissance visible
Microsporum canis	8	10	0
" "	8	5	0
" "	8	2,5	0
" "	8	1,25	+
" "	8	0,5	+
Microsporum canis	24	10	0
" "	24	5	0
" "	24	2,5	0
" "	24	1,25	0
" "	24	0,5	0
Microsporum canis	48	10	0
" "	48	5	0
" "	48	2,5	0
" "	48	1,25	0
" "	48	0,5	0

II - Inhibitions obtenues avec le produit pur

Dermatophytes	Temps de contact (heures)	Concentration (mg/ml)	Croissance visible
Microsporum canis	8	10	0
" "	8	5	0
" "	8	2,5	0
" "	8	1,25	0
" "	8	0,5	0
Microsporum canis	24	10	0
" "	24	5	0
" "	24	2,5	0
" "	24	1,25	0
" "	24	0,5	0
Microsporun canis	48	10	0
" "	48	5	0
" "	48	2,5	0
" "	48	1,25	0
" "	48	0,5	0

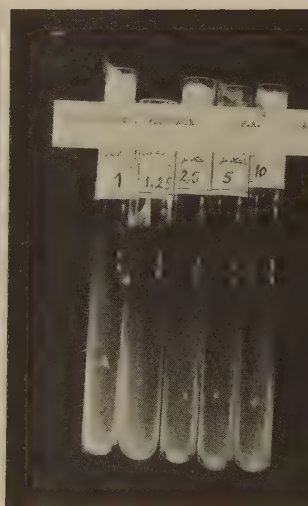
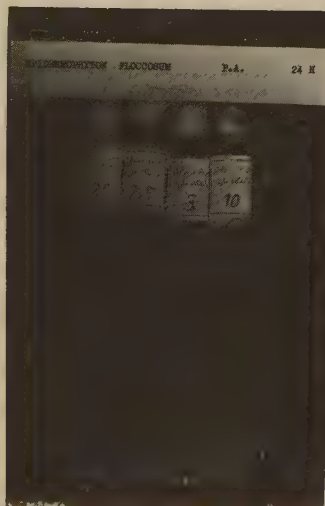
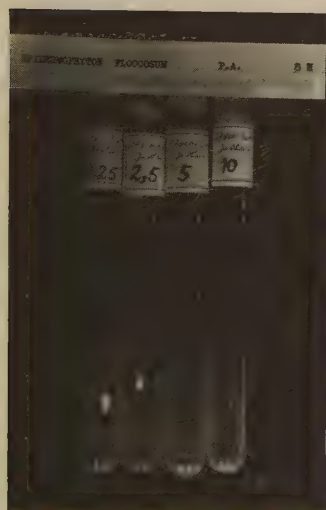
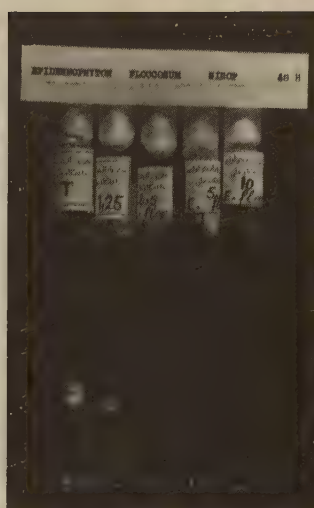
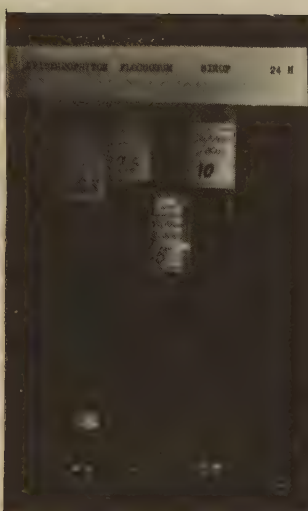
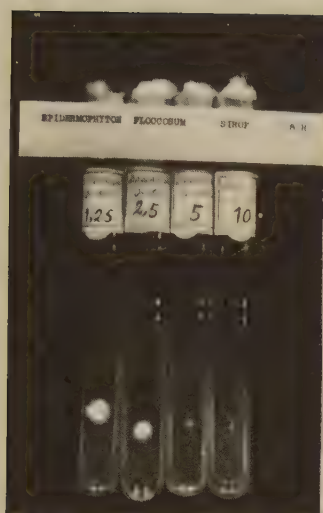


I - Inhibitions obtenues avec le produit brut

Dermatophytes	Temps de contact (heures)	Concentration (mg/ml)	Croissance visible
Epidermophyton floccosum	8	10	0
" "	8	5	0
" "	8	2,5	+
" "	8	1,25	+
" "	8	0,5	+
Epidermophyton floccosum	24	10	0
" "	24	5	0
" "	24	2,5	0
" "	24	1,25	+
" "	24	0,5	+
Epidermophyton floccosum	48	10	0
" "	48	5	0
" "	48	2,5	0
" "	48	1,25	+
" "	48	0,5	+

II - Inhibitions obtenues avec le produit pur

Dermatophytes		Temps de contact (heures)	Concentration (mg/ml)	Croissance visible
Epidermophyton floccosum		8	10	0
"	"	8	5	0
"	"	8	2,5	+
"	"	8	1,25	+
"	"	8	0,5	+
Epidermophyton floccosum		24	10	0
"	"	24	5	0
"	"	24	2,5	0
"	"	24	1,25	0
"	"	24	0,5	0
Epidermophyton floccosum		48	10	0
"	"	48	5	0
"	"	48	2,5	0
"	"	48	1,25	0
"	"	48	0,5	0

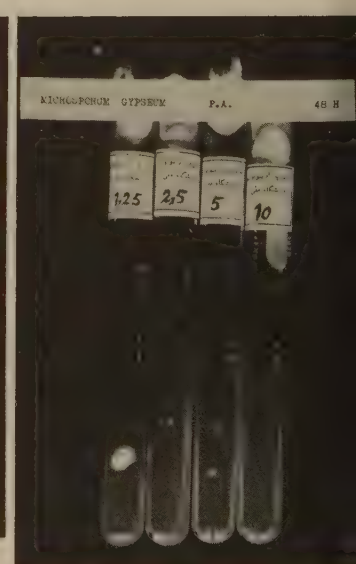
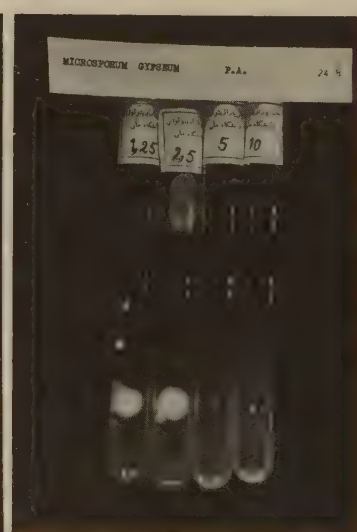
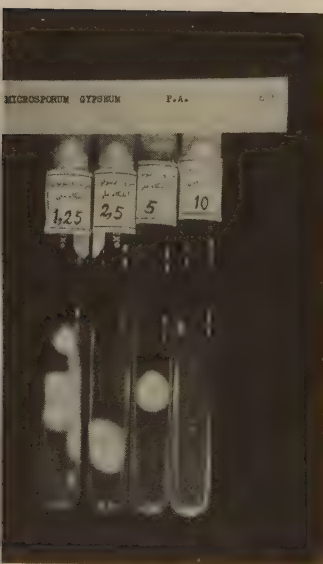
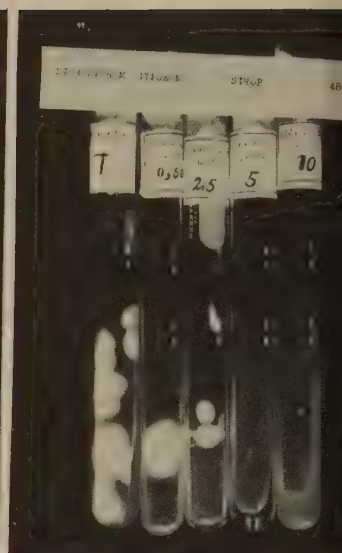
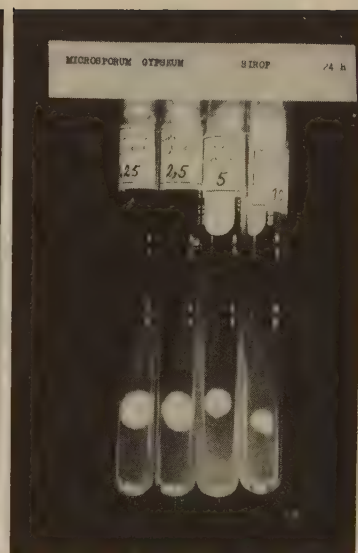
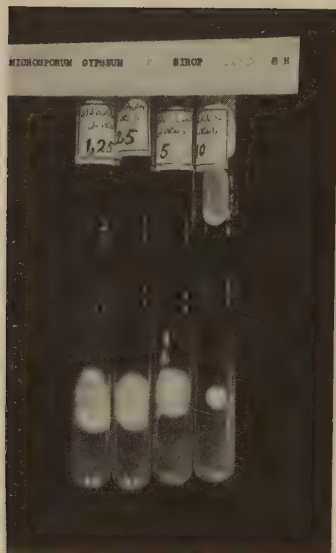


I - Inhibitions de croissance obtenues avec le produit brut

Dermatophytes	Temps de contact (heures)	Concentration (mg/ml)	Croissance visible
Microsporum gypseum	8	10	+
" "	8	5	+
" "	8	2,5	+
" "	8	1,25	+
" "	8	0,5	+
Microsporum gypseum	24	10	+
" "	24	5	+
" "	24	2,5	+
" "	24	1,25	+
" "	24	0,5	+
Microsporum gypseum	48	10	0
" "	48	5	0
" "	48	2,5	+
" "	48	1,25	+
" "	48	0,5	+

II - Inhibitions obtenues avec le produit pur

Dermatophytes	Temps de contact (heures)	Concentration (mg/ml)	Croissance visible
Microsporium gypseum	8	10	0
" "	8	5	+
" "	8	2,5	+
" "	8	1,25	+
" "	8	0,5	+
Microsporium gypseum	24	10	0
" "	24	5	0
" "	24	2,5	+
" "	24	1,25	+
" "	24	0,5	+
Microsporium gypseum	48	10	0
" "	48	5	0
" "	48	2,5	0
" "	48	1,25	+
" "	48	0,5	+

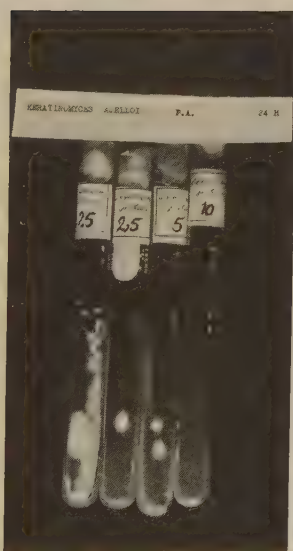
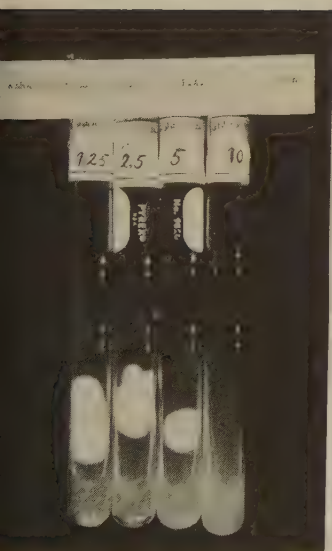
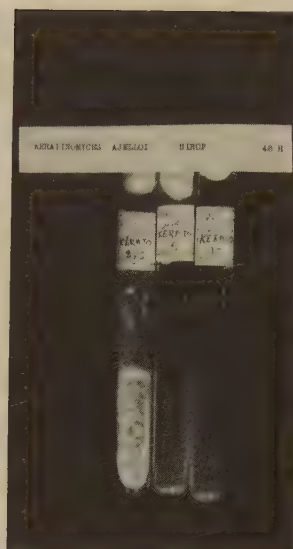
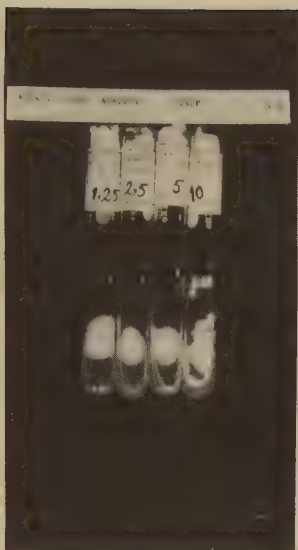
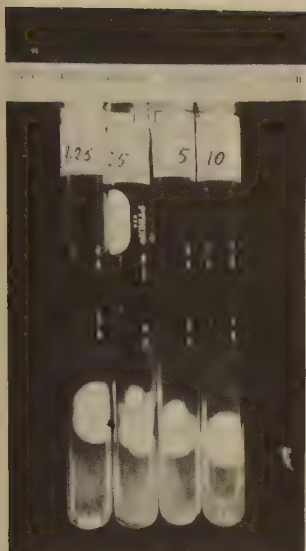


I - Inhibitions de croissance obtenues avec le produit brut

Dermatophytes		Temps de contact (heures)	Concentration (mg/ml)	Croissance visible
Keratinomyces	ajelloi	8	10	+
"	"	8	5	+
"	"	8	2,5	+
"	"	8	1,25	+
"	"	8	0,5	+
Keratinomyces	ajelloi	24	10	+
"	"	24	5	+
"	"	24	2,5	+
"	"	24	1,25	+
"	"	24	05,	+
Keratinomyces	ajelloi	48	10	0
"	"	48	5	0
"	"	48	2,5	+
"	"	48	1,25	+
"	"	48	0,5	+

II - Inhibitions obtenues avec le produit pur

Dermatophytes	Temps de contact (heures)	Concentration (mg/ml)	Croissance visible
Keratinomyces ajelloi	8	10	0
" "	8	5	+
" "	8	2,5	+
" "	8	1,25	+
" "	8	0,5	+
Keratinomyces ajelloi	24	10	0
" "	24	5	+
" "	24	2,5	+
" "	24	1,25	+
" "	24	0,5	+
Keratinomyces ajelloi	48	10	0
" "	48	5	0
" "	48	2,5	0
" "	48	1,25	+
" "	48	0,5	+



I - Inhibitions obtenues avec le produit brut

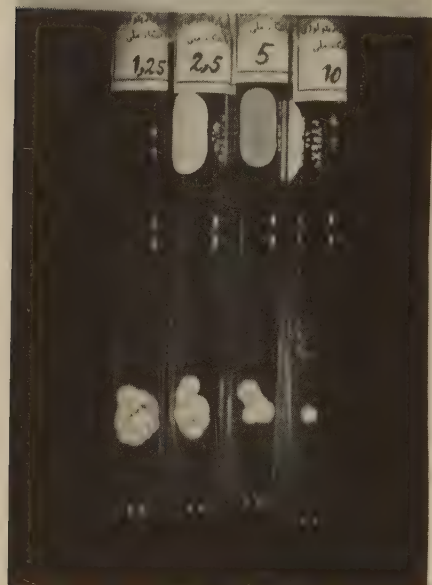
Dermatophytes		Temps de contact (heures)	Concentration (mg/ml)	Croissance visible
Trichophyton mentagrophytes		8	10	+
"	"	8	5	+
"	"	8	2,5	+
"	"	8	1,25	+
"	"	8	0,5	+
Trichophyton mentagrophytes		24	10	+
"	"	24	5	+
"	"	24	2,5	+
"	"	24	1,25	+
"	"	24	0,5	+
Trichophyton mentagrophytes		48	10	+
"	"	48	5	+
"	"	48	2,5	+
"	"	48	1,25	+
"	"	48	0,5	+

II - Inhibitions obtenues avec le produit pur

Dermatophytes	Temps de contact (heures)	Concentration (mg/ml)	Croissance visible
Trichophyton mentagrophytes	8	10	+
" "	8	5	+
" "	8	2,5	+
" "	8	1,25	+
" "	8	0,5	+
Trichophyton mentagrophytes	24	10	±
" "	24	5	+
" "	24	2,5	+
" "	24	1,25	+
" "	24	0,5	+
Trichophyton mentagrophytes	48	10	±
" "	48	5	+
" "	48	2,5	+
" "	48	1,25	+
" "	48	0,5	+

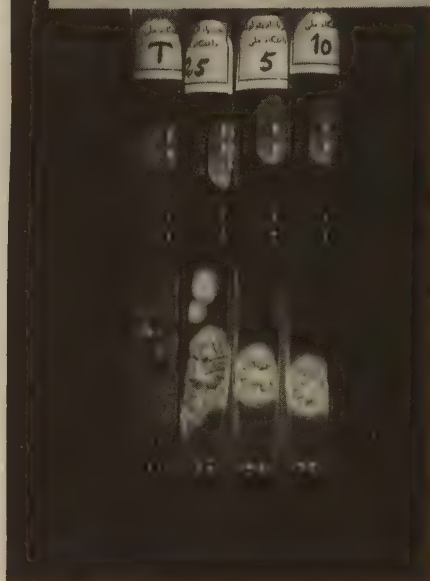
TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES

P.A. 24 H



BOOPULARIOPSIS BRIVICAULIS

P.A. 48 H



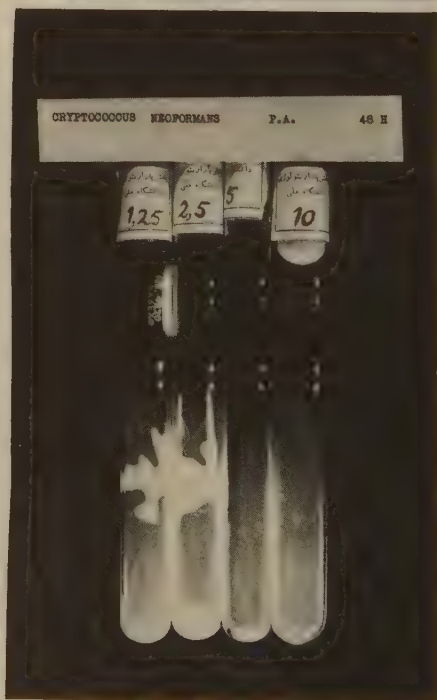
CRYPTOCOCCUS NEOPORMANS

SIROP 48 H



CRYPTOCOCCUS NEOPORMANS

P.A. 48 H



I - Inhibitions obtenues avec le produit brut

Dermatophytes	Temps de contact (heures)	Concentration (mg/ml)	Croissance visible
Trichophyton rubrum	8	10	+
" "	8	5	+
" "	8	2,5	+
" "	8	1,25	+
" "	8	0,5	+
Trichophyton rubrum	24	10	+
" "	24	5	+
" "	24	2,5	+
" "	24	1,25	+
" "	24	0,5	+
Trichophyton rubrum	48	10	+
" "	48	5	+
" "	48	2,5	+
" "	48	1,25	+
" "	48	0,5	+

II - Inhibitions obtenues avec le produit pur

Dermatophytes	Temps de contact (heures)	Concentration (mg/ml)	Croissance visible
Trichophyton rubrum	8	10	+
" "	8	5	+
" "	8	2,5	+
" "	8	1,25	+
" "	8	0,5	+
Trichophyton rubrum	24	10	+
" "	24	5	+
" "	24	2,5	+
" "	24	1,25	+
" "	24	0,5	+
Trichophyton rubrum	48	10	+
" "	48	5	+
" "	48	2,5	+
" "	48	1,25	+
" "	48	0,5	+

Discussion

A) Activités des produits (bruts et purifiés) sur les champignons levuriformes

Les produits n'ont exercé aucune activité inhibitrice sur le développement normal des levures étudiées. La concentration et le temps de contact ne jouent aucun rôle sur cette activité. Seule la production des chlamydospores de Candida albicans est inhibée à la concentration 2,5 mg/ml et à la durée de contact de 8 heures. Les deux produits sont dépourvus de pouvoir photosensibilisant sur le Candida in vitro. Le rôle de la concentration et celui de la durée de contact sont à noter dans l'étude de l'activité in vivo des produits, car ici encore la concentration la plus forte et la durée de contact la plus longue sont aptes à inhiber le pouvoir pathogène de Candida albicans pour le lapin.

B) Activités des produits (purifiés et bruts) sur les champignons filamenteux

Parmi les champignons filamenteux, les moisissures n'ont montré aucune sensibilité dans les conditions de nos essais. Quant aux Dermatophytes, la sensibilité varie selon la nature du produit étudié (pur ou brut), la concentration et la durée du contact. D'une façon générale, ces deux derniers facteurs peuvent influencer d'une façon considérable le pouvoir inhibiteur (en élevant le taux de la concentration ou la durée de contact, on arrive à l'obtention de résultats spectaculaires. L'espèce la plus sensible vis-à-vis des deux produits est le Microsporum canis dont le développement est inhibé avec la concentration 1,25 mg/ml pendant la plus courte durée de contact (8 heures). Trichophyton rubrum et Trichophyton mentagrophytes sont deux espèces plus résistantes, car ils poussent quand même en présence de la concentration la plus forte (10 mg/ml) du produit, même après le contact le plus prolongé (48 heures). Seule le Trichophyton rubrum s'est montré le champignon insensible vis-à-vis du produit pur.

C H A P I T R E I I I

ACTIVITES SUR LES PROTOZOAIRES

- Matériels et méthodes

- Résultats

Nous avons étudié l'activité des produits sur un flagellé, Leptomonas ou la forme promastigote de Leishmania tropica et un Sporozoaire, Toxoplasma gondii.

a) Activité du Leptomonas

Les produits (brut et pur) ont été ajoutés à raison de 6,4 et 2 mg/ml dans des tubes renfermant des Leptomonas cultivés dans le milieu N.N.N. (Novy, Mc Neal, Nicolle), âgés de 24 heures. L'incubation a été faite à l'étuve à 25°C et la lecture des résultats pratiquée dans les 24 et 48 heures suivant l'addition du produit. Pour l'enregistrement des résultats, la mobilité (mouvement plus ou moins rapide du corps cellulaires et battements des flagelles) des Leptomonas traités a été comparée avec celle du témoin. Les résultats ont montré que les Leptomonas ayant été en contact avec les concentrations de 6 et 4 mg/ml sont morts en présentant le début d'une lyse, tandis que les Leptomonas en contact avec la concentration de 2 mg/ml sont restés encore vivants (battements de leurs flagelles), mais les mouvements se sont montrés moins rapides en comparaison avec le témoin. Le rôle de la durée de contact n'a pas été significatif.

b) Activité sur Toxoplasma

L'ascite provenant des souris inoculées par la voie intrapéritonéale de 3-4 jours auparavant a été ajoutée de 2,5 ; 5 et 10 mg/ml de chacun des produits étudiés et conservés pendant 24 heures dans le réfrigérateur à 4°C. 1/2 ml de l'ascite ainsi traitée a été réinjectée par la même voie à des souris saines. Une souris a reçu la même quantité d'ascite non traitée à titre de témoin. Les souris inoculées avec les concentrations 5 et 10 ne sont jamais mortes, tandis que le témoin est mort en l'espace de quatre jours après l'inoculation. La souris inoculée avec la concentration la moins forte (2,5 mg/ml) est également morte mais plus tardivement (après deux semaines).

Test de toxicité invivo

L'inoculation à des souris par les voies intrapéritonéales et intraveineuses de 100 mg/kg des produits n'a jamais abouti à leur mort.

Dans les jours suivants l'inoculation on a seulement observé une élévation de la formule leucocytaire qui est redevenue normale par la suite.

Les souris inoculées ont parfaitement gardé leur appétit et elles ont conservé leur poids. Cependant elles se sont montrées plus agitées que les souris témoins.

Résultats

Les produits ne semblent donc pas être toxiques, au moins dans notre temps d'observation.

CONCLUSION

Conclusion

L'étude présentée dans ce chapitre permet de conclure que l'activité antibactérienne des produits expérimentés est nettement supérieure à celle exercée sur les champignons car en utilisant des concentrations très faibles sur les bactéries, nous avons pu obtenir des résultats beaucoup plus satisfaisants qu'avec les concentrations plus fortes sur les champignons. Par conséquent, nous pensons que le pouvoir antifongique de ces produits est moins important. Quant à l'activité sur les protozoaires, elle paraît susceptible de retenir l'attention.

La cnicine est donc efficace sur la plupart des germes qui provoquent des maladies infectieuses, en particulier Bacillus anthracis qui produit la maladie du Charbon chez le bétail et aussi chez les employés des abattoirs ne travaillant pas dans des conditions stériles, les Shigelles qui produisent la dysenterie microbienne et les Salmonelles, agents de la typhoïde et paratyphoïde, tous deux fréquents en Iran. La Leishmania tropica qui soulève le problème de la Leishmaniose dans les villages d'Iran où l'on ne prête pas attention à l'hygiène personnelle et enfin la Toxoplasmose également fréquente en Iran.

Enfin, l'absence de toxicité pour la souris, la thermostabilité et le manque de pouvoir photosensibilisant confèrent un intérêt potentiel indéniable à la cnicine.

CONCLUSION GENERALE

- A) L'étude microscopique de la morphologie des différentes parties de la plante nous a été très utile du point de vue de la taxonomie pour distinguer des espèces macroscopiquement très voisines et du point de vue de la morphologie des organes sécréteurs qui permettent au chimiste de choisir sa méthode d'extraction par l'observation de tel ou tel organe. Il y a donc une relation entre la morphologie des glandes et la nature des principes actifs. Le principe actif, la cnicine, est synthétisé dans les cavités sous cuticulaires des poils sécréteurs de la feuille, fleur et involucre.
- x
- b) La méthode de Mabry fut très efficace pour l'extraction des lactones sesquiterpéniques. L'existence de Cnicine dans cette plante traduit bien son goût amer et les examens individuels des feuilles, fleurs, involucre, tiges, racines, montrent que les feuilles contiennent le maximum de cette substance, ce qui prouve une relation entre l'abondance des glandes sécrétrices et le maximum de concentration de Cnicine dans les feuilles.
- c) L'activité antibactérienne des produits expérimentés est supérieure à l'activité antifongique, car en utilisant les concentrations très faibles sur les bactéries nous pouvons obtenir des résultats plus satisfaisants qu'avec les concentrations plus fortes sur les champignons. L'activité des produits bruts est plus remarquable chez les gram positives tandis que la Cnicine est plus efficace sur les germes gram négatifs.

L'activité de la Cnicine mise en évidence sur les protozoaires est aussi une activité nouvelle et intéressante dans le domaine des affections à protozoaires, fréquentes dans mon pays.

Enfin, la thermostabilité, l'absence de toxicité pour la souris et le manque de pouvoir photosensibilisant de ce produit ouvrent des perspectives pour une application de la Cnicine dans le domaine des maladies infectieuses.

BIBLIOGRAPHIES

BIBLIOGRAPHIE DE LA PARTIE BOTANIQUE

- ACH, D. et Mascré M., La cellule végétale, tome I, 1965, Guy Deysson Edit.
- ENTHAM, G. Notes on the classification, history and geographical distribution of Compositae, J. Linn., Soc. Bot 13, 335-577, 1873
- ENTHAM, G. In Genera plantarum 2(1), 163-533, 1873, Reeve and Co. London
- ISSIER, E. Diagnose Plantarum Orientalium Novarum ser. 1, 6 ; 134, 1846
- ORNMULLER, J. in "Flora of Afghanistan 1960. 395 by Siro Kitamura"
- E CANDOLLE, A.P. Prodromus systematis vegetalis regni vegetabilis 6 : 609 (1838)
- ASSINI Cinarocephales in "Dictionnaire des Sciences Naturelles", 9, 226-227, 1817 F.G. Levrault, Edit. Strasbourg, Paris.
- HADFAUD, M. et Emberger L., Les végétaux vasculaires, traité de botanique systématique, tome II, 1960, Masson
- RETE, P. Précis de botanique systématique des angiospermes, 1959, Masson et Cie. Edit. Paris.
- OL, A. Recherches sur l'appareil sécréteur interne des Composés, J. Bot. 18, 110-133, 153-175, 1904
- AVIS, P.H. Flora of Turkey, vol. 5. 546 (1975)
- ITTRICH, M. Cynarea systematic review. In. "Heywood, V.H.. The biology and chemistry of the Compositae", Vol. 2, 1977. Academic Press, London
- SFANDIARI, A. Liste préliminaire des plantes de l'Herbier du Ministère de l'Agriculture de l'Iran (partie des Compositae), 1967
- UGENE-BELIN Cours de botanique et de biologie végétale, 1960
- UILLIERMOND, A. et Mangenot G., Précis de biologie végétale, 2ème Edit. 1940. Masson et Cie Edit. Paris.
- ANDEL-MAZZETTI, H. Von, Wissenschaftliche Ergebnisse der Expedition nach Mesopotamien 1960 Teridophyta und Anthodphyta aus Mesopotamien und Kurdistan sowie Syrien und Prinkipo 1921-1914

- HEYWOOD, V.H. et Harborne J.B., the Biology and the chemistry of the Compositae, vol. I, II, 1977, Acad. Press, London
- LECLERC, H. Leclerc R.V. Guérir par des plantes, 1954, Givov Edit.
- LEPPIK, E.E. Evolutionary correlation between plants, insects, and soils, J. Am. Soc. Lih Est. Am 3, 28-50, 1963
- LEPPIK, E.E. Evolutionary correlation between plants, animals and their environment, Adv. Frant. pl. sci. 25, 1-32, 1970
- LEVIN, D.A. Turner B.L., Clutch size in the Compositae in evolutionary ecology, 215-222, 1977, Slonehouse and Perrins Edit. London
- MABRY, T.J. In "Perspectives in phytochemistry", Harborne J.B., and Swain T. 1-46, Acad. Press. London 1969
- MABRY, T.J. In "Phytochemical phylogeny", ed. Harborne, J.B., PP. 269-300, Acad. Press. London, 1970
- MATVEEBA, T.S. Tichonora, A.D. 1969
Chromosomes numbers of some species of USSR II. Plants of Central Asia Bot. Journ. SSSR
- PARIS, F. Schauenberg P. Guide des plantes médicinales, 3ème Edit. Delachaux et Niestlé SA Paris 1977
- PARIS, R.R. Moyse H., Précis de matière médicale dicotylédones gamopétales, tome 3, 1971. Masson et Cie Edit.
- PARSA, A. Flore de l'Iran, vol 3, 1946
- RAVEN and Axelrod, Fossil pollen of the family Asteraceae, 1974
- RECHINGER, K.H. Flora iranica (Cynarae - Partie centaurea, Vol. II, sous presse)
- RODRIGUEZ, E. Dermatologically, Active Sesquiterpene Lactone in Trichomes of Parthenium hysterophorus L. (Compositae)
Experimentia, 32(2)236-8, 1976
- SABETI, H. Les études bioclimatiques de l'Iran, 1969
- VALNET, J. Duraffourd C., Une médecine nouvelle phytothérapie et aromathérapie - Presse de la Renaissance, 1978
- WAGENITZ, G. Systematic and phylogeny of the Compositae (Asteraceae) Pl. Syst. Evol. 125, 29-46
- ZARGARI, A. Les plantes médicinales, vol. 2, 1968

BIBLIOGRAPHIE DE LA PARTIE PHYTOCHIMIQUE

- ASU, N. and Rastogi R.P. Triterpenoïd, Saponins and Sapogenins. *Phytochem.* 6, 1249-1270, 1967
- OBBITT, J.M. Thin layer chromatography Reinhold Pub. Co New-York, 1963
- UPIUS, G. Mitchell J.C. and Towers G.H.N. Reaction of alantolacton, an allergenic sesquiterpenlactone with some amino-acids. Resultant loss of immunologic reactivity. *Can J. Biochem.* 52, 575-578, 1974
- UPIUS, G.⁴ and Brisson J. Toxic effect of alantolactone and dihydroalantolactone in in vitro culture of leucocytes. *Chem. Bio. Interact.* 15(3), 205 - 17, 1976
- ODWIN, T.W. Aspects of terpenoid chemistry and biochemistry. Acad. Press, New-York, ed. 1971
- RAHARCZYK, H. Drozd B., Haldon B. Sesquiterpene lactone from herb of *Anthemis nobilis* L. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, 29(4), 419-23, 1977
- RIECO, P.A. Noguez J.A., Hiroi K., Nishizawa M., System of mono and bifunctional α -methylene γ -lactones systems as potential tumor inhibitors. *J. Med. Chem.* 20(1), 71-6, 1977
- ALL, I.H. Lee K.H., and Eigebaly, S.A. Antitumor agent XXVII : effects of Helenalin an anaerobic and aerobic metabolism of Ehrlich ascite' s cells. *J. Pharm. Sci* 67(4), 552-4, 1978
- ARBONE, J.B. Terpenoids in plants. Acad. Press, London, 1967
- ARBORNE, J.B. Phytochemical methods. Chapman and Hall. London 1975
- AYWOOD, J.B. Harborne V.H. Turner B.L., The biology and chemistry of the Compositae Acad. Press, London, New-York. Vol. I and II, 1977
- ERSHENSON, H.M. UV and visible absorption spectra, Vol. II 1955-9, Acad. Press, New-York, 1961
- ERSHENSON, H.M. Infra red absorption spectra Vol. I 1945-57. Acad. Press New-York, 1959

- KOHLMUNZER, S. Grzybnek J., Kisiel W. Biological activity of vernoflexuoside on the basis of allium test. *Separatum Experimentia*, 32, 172-173, 1976
- KUBO, I. Taniguchi M., Satomura Y., Kubota T. Antibacterial activity and chemical structure of diterpenoids. *Agr. Biol. Chem.* 38(6), 1261-2, 1974
- KUPCHAN, S.M. Reaction of Endocyclic α, β - Unsaturated γ -Lactones with Thiols. *J. Org. Chem.*, vol. 35 3539-3543, 1970
- KUPCHAN, S.M. Ashmoke J.W., Sneden A.T. Structure activity relationships among in vitro active germacranolids. *J. Pharm. Sci.* 67(6) 865-7, 1978
- KUPCHAN, S.M. Fessler D.C., Eakin M.A. and Giacobbe T.J., Reactions of Alpha Methylene Lactone Tumor Inhibitors with Model Biological Nucleophiles *Science* vol. 168, 376-380, 1970
- MABRY, T.J. In "Perspectives in phytochemistry", Harborne J.B., and Swain T. PP. 1-46, Acad. Press, London, 1969
- MABRY, T.J. In "Phytochemical phylogeny", ed. Harborne, J.B. PP. 269-300, Acad. Press. London, 1970
- PARIS, R.R. Moyse, H. Précis de matière médicale, tome II, gamopétales, 428-429. Masson et Cie Paris 1971
- PRIDHAM, J.B. Terpenoids in plants. Acad. Press, London, 1967
- RODRIGUEZ, E. Towers G.H.N., Mitchell J.C. Biological activities of sesquiterpene lactone. *Phytochemistry*, 15, 1573-80, 1976
- RUNECKLES, V.C. Recent advances in phytochemistry. Plenus press New-York 1975
- RUSTAYAN, A. et Niknejad A. Cnicin : a sesquiterpene lactone from *Centaurea belangeriana* DC (tribe Cynareae, Compositae) 1-7, 1979, en préparation
- SAMEK, Z. et M. Houlb, V. Herout et F. Sorm, Revision of the Structure of Cnicin *Tetrahedron Letters*, 2931-2934 (1969)
- SHIBAOKA, H. Mitsuhashi M. and Shomokori Y. Promotion of adventitious root formation by heliangine and its removal by Cystéine. *Plant and cell physiol.* 8, 161-170, 1967
- SUCHY, M. and V. Benesova, V. Herout and F. Sorm, Die Struktur des Cnicins, eines Sesquiterpen - Lactons aus *Cnicus benedictus* L. *Chem., Ber.*, 93, 2449-2456 (1960)

- MITH, C.H. Larner J., Thomas A.M. and Kupchan S.M.
Inactivation of Glycogen synthase by the
tumor inhibitor vernolepin
Biochim., Biophys. Acta 276 (1972) 94-10, 1970
- URNER, W.B. Fungal metabolites, 446. Acad. Press. London 1971
- SCHESCHE, R. Progrès de la chimie des substances a activité
antibiotique des plantes supérieures. Pharma.
Internat. no 2, 17-23, 1971
- AN HAELEN Van Haelen M. Activité antiobiotique et cytoto-
ASTRE R. xique de la Cnicine et de ses produits d'hydro-
lyse. Planta Med. 29(2), 179-89, 1976

BIBLIOGRAPHIE DE LA PARTIE MICROBIOLOGIQUE

- AINSWORTH, G.C. Sparrow, F.K., and Sussman A.S. The Fungi : An advanced treatise, Vol. IV A and B. Academic Press, New York, 1973
- AINSWORTH, G.C. and Bisby. Dictionary of the Fungi. Commonwealth Mycological Institute, Kew GB., 1972
- AJELLO, L. Georg, L.K., kaplan, W., Kaufman, L. Laboratory manual for medical mycology. C.D.S., U.S. Dept of Health, Education and Welfare, Atlanta.
- ANTHONY, C.P. and Kolthoft, N.J. Textbook of anatomy and physiology. The c.v. Mosby Company St-Louis, 9th Ed. 1975
- BDILLET, G. Les Dermatophytes. Atlas clinique et biologique, Varia Edit. Paris 1973
- BAILEY, R.W. and Scott, G.E. Diagnostic Microbiology. C.V. Mosby Co, St-Louis, 1970
- BARRON, G.L. The genera of Hyphomycetes from soil. The Williams and Wilkins Edit. Baltimore, 1968
- BARKER, A.N. Gould, G.W. and Wolf J. Spore Research, Academic Press, New York, 1974
- BARRY, A.L. Garcia F. and Thrupp L.D. An improved single disk Method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly growing pathogens. Amer. J. Clin Pahtol., 53, 149-158, 1970.
- BAUER, A.W. Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. and Trunk, M. Antibiotic sensitivity testing by a standardized single - Disk method, Amer. J. Clin. Path. 45 : 493-496, 1966.
- BUCHANAN, R.E. and Gibbons, N.E. Bergey's manual of determinative bacteriology. The Williams and Wilkins Co, Baltimore, 8th Edit, 1974.
- BRAY, R.A. Leishmania, Annu. Rev. Microbiol., 28,189-217, 1974
- BROWN, H.W. Basic clinical Parasitology. Appelton-Century-Crofts. Inc. New York 3rd. Edi. 1969
- BRUMPT, E. Précis de parasitologie, 2ème partie, Masson Edit. Paris
- CONANT, N.F. Smith D.T., Baker R.D. and Callaway, J.L. Manual of clinical Mycology W.B. Saunders Co, Philadelphia, 3rd Edi. 1971.

- WIS, B.D. Dublecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S. Wood, W.B. Jr. and Mc Carty, M. Microbiology. Hoeber Medical division. Harper and Row, New York, 2nd Ed., 1973.
- WILCO Manual of dehydrated culture media and Reagents, Difco Laboratories. Detroit. Mich., 9th Ed. 1953.
- WILLE, H.W. Bacterial metabolism, Academic Press Inc. New-York, 1969
- WILHET, E. Segretain G., et Mariat F. Mycologie médicale in Techniques en parasitologie et en mycologie, Flammarion Edit. Paris 1972.
- WILNEY, E.L. and Laskin, A.I. The problems of drug resistant pathogenic bacteria Ann. N.Y. Acad. Sci. vol. 182, 1971
- WILBY, J. Cours de mycologie médicale comparée. Vigot Edit. Paris 1969.
- WILALI, A. Bijean, H., Mortazavi, A. Inhibition photochimique du développement in vitro d'une souche de Candida albicans. Bull. Soc. Fr. Mycol. Med. Tome 5, no 2, 115-118, 1976.
- WILMANN, E.A. The Fungi (traduction de l'allemand) Hafner Publishing Co, New-York, London 1952.
- WILLL, K.G. Protozoology. Springer-Verlag, New-York, 1973.
- WILL, J.L. Flowers, T.J. and Roberts, R.M. Plant cell structure and metabolism. Longman Group, Ltd. London-1974.
- WILWICK, H.L. Weiss P., and Fekely F.R., J.R. Application of microtitration techniques to bacteriostatic and bacteriocidal antibiotic susceptibility testing, J. Lab. Clin. Med. 72, 511-516, 1968
- WILZEN, E.L. Gordon, M.A. et Reeds F.C. Laboratory identification of pathogenic fungi simplified. Thomas Edit. Springfield, 1970.
- WILYVER, A.J. and Van Niel, C.B. The microbes' contribution to biology. Harvard University Press, Cambridge, Mass, 1956.
- WILNETTE, E.H. Spaulding E.H., and Truant J.P. Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology Washington, D.C. 2d Ed. 1974.
- WILS; G.M. et Hopper M.E. An introduction of Medical Mycology. Y.R.B.K. Edit. Chicago 1948.

- LILLY, V.G. et Barnett H.L. Physiology of the fungi. Mc Graw-Hill Edit. New-York, 1951.
- LODDER, J. et Coll. The Yeasts. North Holland Edit. Amsterdam, 1970-71
- MANWELL, R.D. Introduction to protozoology. St-Martin's Press Inc. New-York, 1961.
- MARKELL, E.K. and Voge M. Medical Parasitology. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1965.
- MITSCHER, L.A. Antimicrobial agents from higher plants. In "Recent advances in Phytochemistry", vol. 9. Edit. V.C. Runeckles Plenum Press, New-York, 1975
- MOSS, E.S. and Mc. Quown, A.L. Atlas of Medical Mycology. Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1970.
- OLSEN, O.W. Animal parasites. Their life cycles and ecology University Park Press. Baltimore, 3rd Ed., 1974.
- PERLAMN, D. Advances in applied microbiology, vol. XVII. Academic Press Inc. New-York, 1974.
- PRIER, J.E. Bartola, J. and Friedman, H. Quality control in microbiology. University Park Press Baltimore 1975.
- RAPER, K.B. et Fennell, D.I. The genus Aspergillus. William and Wilkins Co. Edit. Baltimore 1965.
- SCHONBECK, F. "Untersuchungen Über Blüteninfektionen 5. : Untersuchungen an Tulpen" Phytopathol. Z. 59, Heft 3 (1967), 205-224
- SHAPTON, D.A. and Board, R.G. Safety in microbiology. Academic Press New-York, 1972.
- SLEIGH, M. The biology of Protozoa. American Elsevier Publishing Co. Inc. New-York, 1973.
- STANIER, R.Y. Doudoroff M. and Adelberg. E.A. The microbial World. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, N.J. 1970.
- STEWART, J.A. Methods of media preparation for the biological sciences. Charles C. Thomas, Springfield III, 1974.
- SUSSMAN, A.S. and Halvorson, H.O. Spores, Their dormancy and germination. Harper and Row Publishers Inc. New-York 1966.
- VANBREUSEGHEM, R. De Vroey, Ch., Takashio M. Guide pratique de mycologie médicale et vétérinaire, Masson Edi. Paris 1978.

VANHAELEN-FASTRE, R. Activité antibiotique et cytotoxique de la Cnicine.
J. Pharm. Belg., 1972, 27 ; 6, 683-688

WINNER, H.I. and Hurley R. Candida albicans Little Brown and
Co. Boston., 1964

